

Tumor-Stromazell-Interaktion im Lewis-Lungenkarzinom-Modell

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Natasha Vipotnik

aus Borken, Westfalen

Gießen 2012

**Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik IV/V, Hämatologie und Onkologie**

**Direktor: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen**

**Gutachter: PD Dr. A.G. Banat
Gutachter: Prof. Dr. S. Gattenlöhner**

Tag der Disputation: 18.04.2013

In Dank den besten Eltern, Annabelle und Alexander gewidmet

und

all jenen, die die Hoffnung nicht aufgeben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tumorpathologie und das Bronchialkarzinom	2
1.1.1	Tumore	2
1.1.2	Das Bronchialkarzinom	2
1.1.2.1	Risikofaktoren	2
1.1.2.2	Pathologische Prozesse	3
1.2	Klassifikation	5
1.2.1	Die Gruppe der NCSLC (75 %)	5
1.2.2	Die Gruppe der SCLC (25 %)	6
1.3	Behandlung und Prognose	6
1.4	Tumormikroklima	9
1.4.1	Mikroumgebung eines Tumors	9
1.4.2	Zellfunktionsänderungen unter der Interaktion mit Tumorzellen	13
2	Fragestellung	17
3	Material	19
3.1	Medien und Puffer	19
3.2	Verbrauchsmaterialien	20
3.3	Reagenzien, Zytokine und Antibiotika	21
3.4	Antikörper und Färbungen	22
3.5	Geräte	23
3.6	Tiere	23
3.7	Tumorzelllinie	23
4	Methoden	25
4.1	Zellkulturarbeiten	25
4.1.1	Zellkultur von LLC1-Tumorzellen	25
4.1.1.1	Passagieren von LLC1-Zellen	25
4.1.1.2	Einfrieren und Auftauen von LLC1-Zellen	25

4.1.2	Isolation von murinem Knochenmark	26
4.1.2.1	Generation von Makrophagen aus murinen Knochenmarkzellen	26
4.1.2.2	Generation von Monozyten aus murinen Knochenmarkzellen	27
4.2	Wachstum von LLC1-Zellen, Makrophagen und Monozyten unter Zusatz des Multikinaseinhibitors Sorafenib	28
4.3	Cokultivierung	30
4.3.1	Adhären von LLC1-Zellen auf Membranfiltern	31
4.3.2	Interaktion von LLC1-Tumorzellen mit Makrophagen sowie mit Monozyten	32
4.3.3	Ernte der LLC1-Zellen	33
4.3.4	Aufnahme des Überstands	34
4.3.5	Ernte der Makrophagen und Monozyten	34
4.3.6	Interaktion von LLC1-Tumorzellen mit Makrophagen und LLC1-Tumorzellen mit Monozyten unter der Einwirkung von Sorafenib	34
4.3.7	Funktionelle Zellkulturversuche	35
4.3.7.1	ELISA	35
4.3.7.2	BrdU-Assay	35
4.4	Molekularbiologische Arbeiten	36
4.4.1	Immunzytochemie	36
4.4.1.1	Oberflächenfärbung von Makrophagen und Monozyten	36
4.4.1.2	Oberflächenfärbung von LLC1-Zellen	37
4.4.2	Fluoreszenz-Mikroskopie	38
4.5	Statistik	38
5	Ergebnisse	39
5.1	Charakterisierung muriner Makrophagen und Monozyten sowie muriner Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen	39
5.2	Der Effekt konditionierter Medien auf das Proliferationsverhalten von LLC1-Tumorzellen	42
5.3	Das Zytokinexpressionsverhalten von LLC1-Tumorzellen und Monozyten / Makrophagen in Cokultivierung	44
5.4	Der Einfluss von Sorafenib auf das Proliferationsmuster von LLC1-Tumorzellen	48
5.5	Das Zytokinexpressionsmuster von LLC1-Tumorzellen und Monozyten / Makrophagen während gegenseitiger Interaktion unter dem Einfluss von Sorafenib	50

5.6	Das Proliferationsverhalten muriner Makrophagen unter dem Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib	54
5.7	Untersuchung des Wachstumsverhaltens muriner Monozyten unter dem Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib	55
5.8	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	57
6	Diskussion	59
6.1	Problematik	59
6.2	Darstellung der Studie	59
6.2.1	Gesteigerte LLC1-Tumorzellproliferation unter konditionierten Medien	60
6.2.2	Das Proliferationsverhalten von LLC1-Zellen unter Sorafenib	61
6.2.2.1	Das Wachstum von LLC1-Zellen unter der Zugabe von Sorafenib	61
6.2.3	Die Auswirkungen von Sorafenib auf das Wachstum von Makrophagen und Monozyten	62
6.2.4	Der Effekt der Kokultivierung auf das Zytokinexpressionsmuster von LLC1-Zellen und Monozyten / Makrophagen	63
6.2.5	Das Zytokinexpressionsmuster von LLC1-Tumorzellen und murinen Monozyten / Makrophagen in Kokultivierung unter Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib	67
6.3	Fazit	71
6.4	Potenzielle Fehlerquellen	74
7	Zusammenfassung und Summary	77
7.1	Zusammenfassung	77
7.2	Summary	78
8	Abkürzungsverzeichnis	81
9	Abbildungsverzeichnis	83
10	Tabellenverzeichnis	85
11	Literaturangaben	87
12	Ehrenwörtliche Erklärung	105
13	Danksagung	107

1 Einleitung

Im Jahre 2008 erkrankten weltweit ungefähr 12,7 Millionen Menschen an einem Malignom und 7,6 Millionen Menschen verstarben aufgrund einer malignen Neoplasie. Dabei wiesen die größte Inzidenz und Mortalität aller Malignome die Bronchialkarzinome auf (Ferlay J et al., 2010).

In Europa bot sich in derselben Zeit ein etwas anderes Bild der Krankheitsverteilung, wie Ferlay et al., 2010 in einer weiteren, europäisch angelegten Studie zeigen konnten. Hier betrug im Jahre 2008 die Inzidenz der Bronchialkarzinome 12,2 %, damit wies diese Erkrankung die 3. größte Inzidenz unter allen Malignomen auf. Höhere Inzidenzen zeigten nur das Kolorektale Karzinom mit 13,6 % und das Mammakarzinom mit 13,1 %. In Hinblick auf die Sterblichkeit belegten die Bronchialkarzinome allerdings, wie auch weltweit, den vordersten Rang, sie waren für 19,9 % der Malignom bedingten Todesfälle verantwortlich.

Das Geschlechterverhältnis der Bronchialkarzinomprävalenz liegt zurzeit noch deutlich aufseiten der männlichen Bevölkerung. Allerdings zeigt die Prävalenz bei den Männern einen fallenden Trend, wohingegen bei den Frauen, parallel zu ihrem zunehmenden Zigarettenkonsum, steigende Tendenzen festzustellen sind (Powell CA et al., 2008; Rivera MP, 2009; Hammerschmidt S et al., 2009).

Schon heute sterben in den Vereinigten Staaten von Amerika mehr Frauen durch ein Bronchialkarzinom als durch die Summe von Mamma-/Ovarial- und Uteruskarzinomen zusammen (Rivera MP, 2009).

Das Lebenszeitrisiko für einen Raucher an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, liegt derzeit bei etwa 15 %, wohingegen 10 % aller Bronchialkarzinome bei Nichtrauchern auftreten. In diesen Fällen mögen das Passivrauchen und die Exposition gegenüber anderen Karzinogenen eine entscheidende Rolle spielen (Powell CA et al., 2008).

1.1 Tumorpathologie und das Bronchialkarzinom

1.1.1 Tumore

Die Gewebshomöostase in Zellverbänden und Geweben wird durch ein stetes Gleichgewicht an Zellproliferation und Zelluntergang aufrechterhalten. Gesunde Körperzellen haben eine definierte Lebensspanne, an deren Ende sie in Apoptose gehen. Dabei wird der Zellersatz durch die fortwährende Proliferation von Stammzellen gesichert. Unter gesunden Umständen bleiben Zellzahlen, Verteilungen und Lokalisationen konstant (Joyce JA et al., 2009). Ein Zellverband, welcher sich nicht den normalen und gesunden Zellkontrollmechanismen unterwirft und damit die Fähigkeit zur klonalen Expansion mit Erlangung beträchtlicher Größe erhält, wird als Tumor oder auch als Neoplasie bezeichnet. Fehlt diesem Tumor die Potenz zu unbegrenztem Wachstum und Invasion in benachbartes Gewebe, handelt es sich um einen benignen Tumor. Malignen Tumoren hingegen obliegt die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation und Invasion in benachbartes Gewebe. Weiterhin ermöglicht ihnen der Prozess der Metastasierung die Ausbreitung in entfernte Organe. Hierzu lösen sich kleine Tumorzelleinheiten aus dem primären Tumor ab, wandern in das Gefäß- und / oder Lymphsystem ein und gelangen über diesen Weg in andere Organsysteme, in welchen sie destruktiv weiter proliferieren (Darnell J et al., 1990).

1.1.2 Das Bronchialkarzinom

1.1.2.1 Risikofaktoren

Für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms ist nicht ein einziger Faktor verantwortlich, vielmehr braucht es dazu das kumulative Zusammenspiel vieler verschiedener Pathomechanismen, damit im Rahmen einer kontinuierlichen Karzinogenexposition bei zunehmendem Zellschaden ein Tumor entstehen kann (Rojas M et al., 2004; Lam S et al., 1999). Den Hauptrisikofaktor stellt hierbei das Zigarettenrauchen dar (Bartecchi CE et al., 1994; Roland M et al., 1998). 85 - 90 % aller Bronchialkarzinome sind auf Zigarettenkonsum zurückzuführen (Bartecchi CE et al., 1994; Hammerschmidt S et al.,

2009) und das Erkrankungsrisiko eines Rauchers im Vergleich zu dem eines Nichtraucher ist bei Betrachtung aller Bronchialkarzinomklassifikationen um mindestens 14 – 35 % erhöht (Barbone F et al., 1997; Osann KE et al., 1991). Aber auch andere Faktoren wie genetische Mutationen, welche zu DNA-Schäden führen, spielen in der Karzinogenese eine Rolle, wie Wistuba II et al. 1998 zeigen konnten.

1999 konnten Schwartz et al. zeigen, dass sowohl Passivrauchen als auch die Inhalation anderweitiger toxischer Gase und Dämpfe das Bronchialkarzinomrisiko von Nichtrauchern stärker erhöht, als bis dahin angenommen. Für Nichtraucher zählen neben der familiären Vorbelastung und eigenen früheren bronchoalveolären Erkrankungen, die mit chronischer Inflammation und Obstruktion einhergingen, vor allem berufliche Karzinogene zu den größten Risikofaktoren hinsichtlich der Bronchialkarzinogenese. Eine erhöhte Erkrankungsrate weisen besonders Menschen auf, die beruflich Lösungsmitteln, Farben und Verdünnern sowie Abgasen und Ruß ausgesetzt sind (Brenner DR et al., 2010).

1.1.2.2 Pathologische Prozesse

Bronchialkarzinome sind ein Endprodukt von vielen, kleine Schritte umfassenden Veränderungen, welche sich sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene abspielen. Im Rahmen der Karzinogenese vermögen sich im Laufe vieler Jahre aus anfänglichen Zelldysplasien über das Stadium präinvasiver Veränderungen invasive maligne Zellverbände zu entwickeln.

Auf genetischer Ebene betrachtet führen verschiedene, auf das Bronchialepithel einwirkende Noxen zur Tumorentwicklung, welche sich sowohl in morphologischen als auch strukturellen Veränderungen im Zielgewebe manifestieren. Multiple Noxen schädigen die DNA über molekulare Mechanismen und produzieren dabei Mutationen im Bronchialepithel (Roland M et al., 1998). Durch die Mutationen entwickeln die erbgutveränderten Zellen Proliferationsvorteile gegenüber den nicht mutierten Zellen. Dies führt zu einer klonalen Expansion der geschädigten Zellen bei reduziertem Wachstum der gesunden Zellen im Zellverband. Unter Einwirkung weiterer Mutationen ist im Folgenden dann den prämaligne veränderten Zellen die Möglichkeit gegeben, sich im Verlauf zu

invasiv wachsenden Malignomen zu entwickeln (Lee J et al., 1998; Rubens MB et al., 2002).

Besonders anfällig für Mutationen sind vor allem jene Gene, die das Wachstums- und Proliferationsverhalten der Zellen kontrollieren. Am Anfang dieser Multikausalkette stehen zum einen die Suppression von Tumorsuppressorgen sowie zum anderen die Aktivierung von Proto-Onkogenen (Liotta LA et al., 1991). Proto-Onkogene sind Gene, welche der Kontrolle des Zellzyklus dienen, das Zellwachstum und die Zellblutversorgung regulieren sowie die Mechanismen der terminalen Zelldifferenzierung und Apoptose kontrollieren. Eine abnorme Aktivierung dieser Gene durch Punktmutationen, Translokationen oder DNA Amplifikationen vermag hierbei zur Tumorgenese führen. Weiterhin sind Onkogenprodukte über gain-of-function Mutationen positive Effektoren für Transformationen (Bouck N et al., 1990). Überexpression von K-ras und c-Myc sind in der Bronchialtumorgenese häufig beobachtete Phänomene.

Im Gegensatz hierzu entstehen Tumorsuppressorgen nicht erst durch eine abnorme Aktivierung, sondern diese Gene wirken kanzerogen durch ihre Herabregulation oder aber ihren gänzlichen Funktionsverlust. Tumorsuppressorgen kodieren für Proteine, welche sowohl den Zellzyklus als auch das Zellwachstum im Sinne einer Negativregulierung kontrollieren. Sie vermögen die Zellproliferation und das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus zu hemmen und den programmierten Zelltod, die Apoptose, auszulösen. Das bekannteste Tumorsuppressorgen p53 zeigt sich in beinahe allen untersuchten malignen Tumoren entweder herunterreguliert oder aber gänzlich ohne Funktion (Halevy O et al., 1990; Hollstein M et al., 1991).

In ihrer Summe führen die Veränderungen von sowohl Proto-Onkogenen als auch von Tumorsuppressorgen zu einem enorm beschleunigten Wachstum jener Produkte, welche durch die von ihnen kodierten Proteine kontrolliert werden. In dieser Entwicklung geht die unter gesunden Bedingungen herrschende Rücksicht auf gültige Formen und Funktionen der einzelnen Struktureinheiten verloren.

Weiterhin zeigen Tumorzellen oftmals ein verändertes intrazelluläres Zellkommunikationssystem. Hierbei spielen Tyrosinkinasen, Enzyme, welche in der Zellsignalübertragung und im Zellwachstum eine wichtige Funktion einnehmen, eine wichtige Rolle. In gesunden Zellen unterliegen Tyrosinkinasen einer strengen Regulation

und Kontrolle. Kommt es zum Verlust dieser Kontrollmechanismen durch genetische Mutationen oder andere genetische Veränderungen, führt die Enzymdysregulation zu malignen Transformationen (Blume-Jensen P et al., 2001).

Zusätzlich haben maligne Tumore im Gegensatz zu benignen Läsionen die Fähigkeit, in primariusferne Organe über den Blut- sowie Lymphweg zu metastasieren. Diese -meist multiplen- Metastasen in lebenswichtigen Organen sind in der Vielzahl der Fälle für den tödlichen Ausgang der malignen Erkrankungen verantwortlich (Chambers AF et al., 2002).

1.2 Klassifikation

Das wichtigste Klassifikationskriterium zur Unterteilung dieser heterogenen Malignomgruppe ist die Zuordnung des Tumors entweder zu der Gruppe des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) oder der Gruppe des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) (Hammerschmidt S et al., 2009).

Die Klassifikationen basieren zum Großteil auf den lichtmikroskopisch sichtbaren histologischen Charakteristika der Tumorzellen (Brambilla E et al., 2001). Mithilfe dieser Kriterien lassen sich Bronchialkarzinome auf der einen Seite in die Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC), zu welchen Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und Großzellige Bronchialkarzinome gehören, und auf der anderen Seite in Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC) unterteilen. Hierbei herrscht eine enge Korrelation zwischen dem Tumorverhalten sowie zum einen der Prognose und zum anderen der histopathologischen Klassifikation (Beadsmoore CJ et al., 2003).

1.2.1 Die Gruppe der NCSLC (75 %)

1. Plattenepithelkarzinom

Das mit 35 – 40 % am häufigsten vorkommende Plattenepithelkarzinom ist ein vom Bronchialepithel ausgehender maligner, epithelialer Tumor. Charakteristisch für diesen Tumor sind die Ausbildung von Verhornungen und / oder Interzellularbrücken. Weiterhin kennzeichnend für Plattenepithelkarzinome ist ein lokal aggressives Wachstum mit schneller Infiltration benachbarter Strukturen. Als hauptverantwortlicher Risikofaktor für

die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms ist das Zigarettenrauchen anzusehen. 90 % aller Betroffenen sind Raucher.

2. Adenokarzinom

Das Adenokarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor. Entsprechend seines Wachstumsmusters wird dieses Karzinom in tubuläre, papilläre, bronchoalveoläre und solide Typen eingeteilt. Das Adenokarzinom weist unter allen Bronchialkarzinomen die höchste Quote an Nichtraucher auf, wenngleich auch dieser Tumor am häufigsten bei Rauchern beobachtet wird.

3. Großzelliges Bronchialkarzinom

Großzellige Bronchialkarzinome sind undifferenzierte, Nichtkleinzellige Tumore, denen jegliche Merkmale eines Kleinzelligen Karzinoms sowie Drüsen- und Plattenepithelformationen fehlen. Diese Tumorklassifikation macht 10 % aller Bronchialkarzinome aus und wird vorwiegend bei Rauchern gefunden.

1.2.2 Die Gruppe der SCLC (25 %)

Kleinzelliges Bronchialkarzinom

Dieser Tumor ist ein aus kleinen Tumorzellen bestehender maligner epithelialer Tumor. Charakteristisch sind die ausgedehnten Nekrosen und eine hohe Mitoserate. Die Lungenperipherie ist typischer Lokalisationsort. Diese Tumore breiten sich bevorzugt submukös sowohl in den Bronchial- als auch in den Lymphgefäßen aus, wodurch viele Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits multiple Metastasen aufweisen.

1.3 Behandlung und Prognose

Zur Behandlung eines Bronchialkarzinoms stehen zum einen die klassische Zytostatikatherapie als systemische Therapieoption und zum anderen als Lokaltherapie die operative Versorgung sowie die Radiatio zur Verfügung. Hierbei werden lokale und

systemische Therapieverfahren zumeist im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzepts miteinander in Kombination angewandt.

Für das therapeutische Regime ist vor allem die Art des Bronchialkarzinoms entscheidend, da SCLC und NSCLC ein unterschiedliches Ansprechen auf die verschiedenen Therapiemöglichkeiten zeigen. Die Therapie der Bronchialkarzinome verläuft stadienabhängig. Entsprechend den Richtlinien der UICC (Union Internationale Contre le Cancer, Internationale Vereinigung gegen Krebs) werden Bronchialkarzinome im Rahmen der TNM-Klassifikation in 4 Stadien unterteilt. Die TNM-Klassifikation stellt hierbei eine global akzeptierte Methode zur Beschreibung der anatomischen Ausbreitung maligner Erkrankungen dar.

NSCLC

In den frühen Stadien SI/II stellt die operative Tumorentfernung die Methode der Wahl dar. Im Stadium SII wird die Operation durch eine adjuvante platinhaltige Chemotherapie ergänzt. Alternativ steht bei Patienten mit Kontraindikationen zur Operation die Radiotherapie zur Verfügung.

Die fortgeschrittenen Stadien S III und IV stellen sich sehr heterogen dar. Tumore in den Stadien SIII A werden bei fehlenden Kontraindikationen operativ mit adjuvanter Chemotherapie versorgt. Das Stadium SIII B stellt die Domäne der platinbasierten Radiochemotherapie dar. Eine Polychemotherapie mit Platinderivaten in Kombination mit modernen Partnern (Taxane, Gemcitabine, Navelbine) sorgt im Stadium IV in palliativer Zielsetzung für eine Verlängerung der Überlebenszeit auf 10 Monate und eine Minderung der Tumor assoziierten Komplikationen (Hammerschmidt S et al., 2009; Powell CA et al., 2009).

SCLC

Die Tumore der SCLC-Gruppe werden entsprechend ihrer UICC-Stadien in Erkrankungen der limited disease und der extended disease eingeteilt. Allen gemein ist ihr gutes Ansprechen auf Zytostatika.

Das Stadium der limited disease umfasst hierbei die UICC-Stadien I bis III. Patienten dieser Gruppe erhalten eine platinbasierte Radiochemotherapie.

In dem frühen Stadium SI kann individuell über die Möglichkeit einer operativen Sanierung mit adjuvanter Chemotherapie diskutiert werden.

Patienten der Gruppe SIV bekommen eine palliative Chemotherapie mit einem platinhaltigen Medikament als Monotherapie oder auch in Kombination mit weiteren Zytostatika (Hammerschmidt S et al., 2009; Powell CA et al., 2009).

Klassische Zytostatika entfalten ihre toxische Wirkung nicht nur selektiv auf Tumorzellen, sondern auch auf gesundes proliferierendes Gewebe, wodurch sich eine Vielzahl typischer, chemotherapie-assoziiierter Nebenwirkungen ergibt.

Viele der Zytostatika wirken myelosuppressiv und führen dadurch zu Immundefizienz mit erhöhter Infektanfälligkeit, in deren Rahmen viele Patienten Pneumonien oder auch septische Krankheitsbilder erleiden. Weiterhin verursacht die zytostatika-induzierte Schleimhautdestruktion im epigastrischen Kompartiment schwerste dyspeptische Beschwerden wie Übelkeit und Erbrechen. Die Lebensqualität der Betroffenen ist stark eingeschränkt und verschlechtert sich mit Krankheitsprogression und zunehmender Therapiedauer immer mehr.

Eine Heilung der Betroffenen ist in der Vielzahl der Fälle nicht möglich, die 5-Jahres-Überlebensraten sind bei Betrachtung aller Erkrankten mit 10 – 15 % als gering zu betrachten (Beadsmoore CJ et al., 2003; Hammerschmidt S et al., 2009).

Neue und innovative Therapieansätze

Neuere Therapieansätze mit biologischen Antikörpern haben selektiv die Tumorzellen als Angriffsziel, womit eine Optimierung der tumor-spezifischen Toxizität erreicht werden kann.

Eines der ersten lizenzierten Medikamente für den Einsatz in der NSCLC-Behandlung ist Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den vaskulären epithelialen Wachstumsfaktor (VEGF), welches in Kombination mit einer Chemotherapie zum Einsatz kommt.

Weiterhin haben verschiedene Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Erlotinib und Gefitinib, unter definierten Voraussetzungen eine Lizenz in der NSCLC-Behandlung bekommen (Hammerschmidt S et al., 2009; Bisht M et al., 2010).

Sorafenib, ebenfalls einer der neuen biologischen Antikörper mit Zulassung zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms, ist ein Multikinase-Inhibitor (RTK) sowie ein Serin/Threonin-Rezeptor Inhibitor (Ser/Thr). Dabei inhibiert Sorafenib: VEGFR-2/-3, PDGFR- β , Fit-3 und c-KIT.

Dieses kleine, oral einzunehmende Molekül vermag über den Ras/Raf/MEK-Pfad das Tumor- und Endothelzellwachstum zu inhibieren, die Tumorangiogenese zu reduzieren und Apoptose in Tumorzellen zu induzieren. Des Weiteren schwächt Sorafenib die Endothelzellaktivierung und die Rekrutierung von Perizyten zur Gefäßstabilisierung sowie von Stromazellen zum Tumor hin ab (Hipp MM et al., 2008; Porta C et al., 2011; Mangiameli DP et al., 2007).

1.4 Tumormikroklima

1.4.1 Mikroumgebung eines Tumors

Tumore bestehen nicht nur aus entarteten Tumorzellen, sondern sie sind in ein dynamisches und komplexes System aus Zellen und Geweben sowie deren wechselseitigen Interaktionen eingebettet. Diese Einheit aus für sich selbst nicht malignen Zellen und ihren nicht-zellulären Bestandteilen beschreibt der Begriff des Tumormikromilieus. Dieses Mikromilieu ist eine heterogene Mischung aus verschiedenen zellulären Komponenten, zu denen Fibroblasten / Myofibroblasten, myeloische Zellen und Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und lymphatische Zellen, weiterhin Perizyten, glatte Muskelzellen, Gefäße und Endothelzellen gehören, sowie einer Struktur gebenden extrazellulären Matrix (EZM) und der in dieser Matrix gelösten Faktoren (wie diversen Chemokinen und Cytokinen) (Direkze NC et al., 2006; Li H et al., 2007; Zhong L et al., 2008). Mehr als 50 % der gesamten Tumormasse wird von diesen Stromazellen und ihrer EZM gebildet (Stuelten CH et al., 2010).

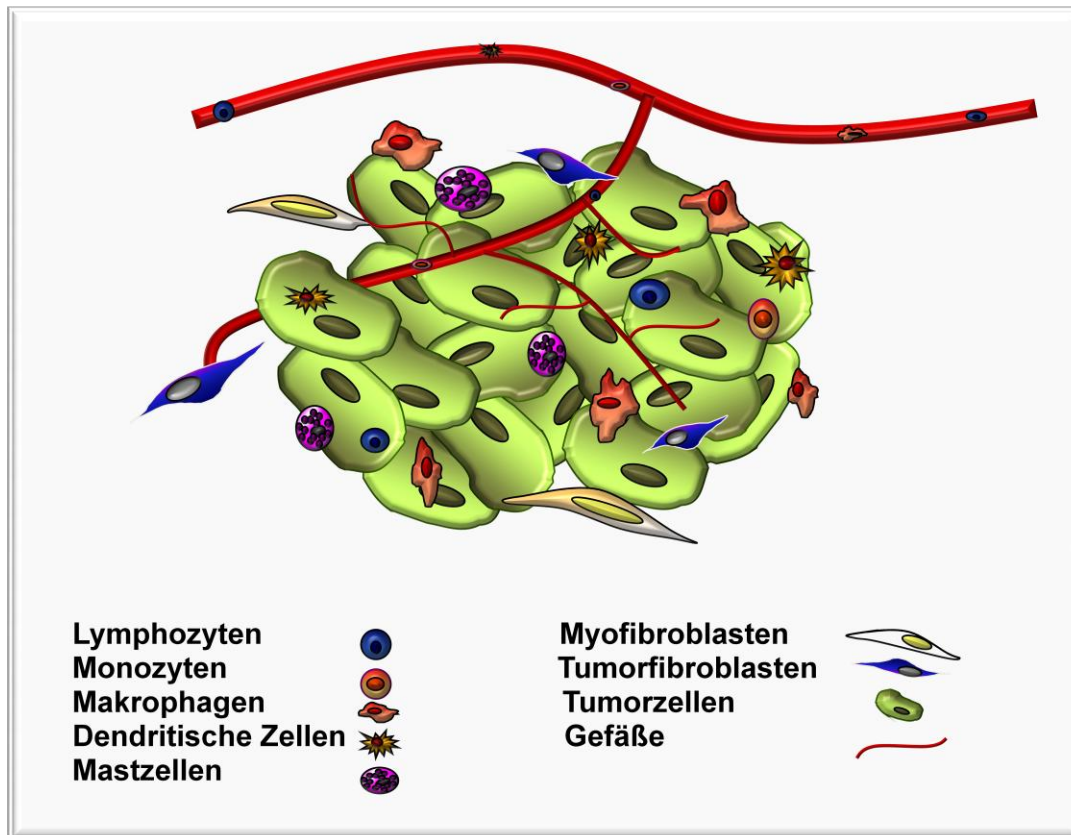


Abbildung 1: Tumormikroumgebung.

Tumorzellen sind von einem komplexen Zell- und Gewebsverband umgeben. Dieser setzt sich aus einer Vielzahl an verschiedenen Stromazellen zusammen. Eingebettet in eine extrazelluläre Matrix setzt sich das Tumorumfeld u. a. zusammen aus Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen, Myofibroblasten, Tumorfibroblasten und Endothelzellen.

Zellen des Tumorstromas und ihre Funktionen im Gesunden

Zu der beeindruckenden Schar sich im Tumorstroma tummelnder Zelltypen gehören vor allem die Zellen des Mononukleären Phagozytensystems, zu welchem Monozyten und Makrophagen gehören. Monozyten gehen im Knochenmark im Rahmen der Hämatopoese aus einer Granulozyten-Monozyten-Stammzelle hervor, treten in den Blutstrom ein und differenzieren sich dort zu Monozyten. In diesem Stadium sind die Monozyten sehr empfänglich für die aus ihrer Umgebung auf sie einwirkenden Stimuli. Diesen folgend können sie aus dem Blutgefäßsystem austreten und in die verschiedenen Körpergewebe auswandern, um sich dort in spezifische, ortsständige Makrophagen zu differenzieren. Als adulte Makrophagen weisen diese multifunktionalen Zellen ein großes und komplexes

Repertoire an Zellenzymen sowie eine starke Phagozytosefähigkeit auf, mithilfe derer sie sowohl körperfremdes Material als auch körpereigene Abfallprodukte beseitigen können. Weiterhin können Makrophagen ein großes Spektrum an immunmodulatorischen Zytokinen sezernieren und als potente antigenpräsentierende Zellen der T-Zell-Aktivierung dienen. In ihrer phänotypischen Ausprägung sind sie dabei in starkem Maße abhängig von ihrer Umgebung und den auf sie einwirkenden Stimuli (Murdoch C, 2008). Generell können Makrophagen zwei großen Gruppen zugeordnet werden, zum einen den M1-Makrophagen und zum anderen den M2-Makrophagen. M1-Makrophagen (klassisch aktiviert) besitzen einen proinflammatorischen Phänotypen und stellen ihre Arbeit in den Dienst ihres Wirtsorganismus: sie verteidigen diesen gegen mikrobiologische Erreger, produzieren eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-12, TNF) (Devaraj S et al., 2011) und aktivieren die Immunantwort. Des Weiteren bekämpfen sie maligne entartete Zellen und arbeiten als antigenpräsentierende Zellen den TH1-Zellen zu (Solinas G et al., 2009). Makrophagen entwickeln diesen Phänotypen durch den Kontakt zu Interferon- γ (INF- γ) oder auch mikrobiologische Stimuli wie Lipopolysaccharide (LPS). Sie selber sind durch die Produktion großer Mengen IL-12, IL-23 und Stickstoffmonoxid (NO) (Peddareddigari et al., 2010; Solinas G et al., 2009; Murdoch C, 2008) gekennzeichnet. Demgegenüber stehen die Makrophagen der M2-Gruppe (alternativ aktiviert), welche einen immunsuppressiven Phänotypen aufweisen und aus dem Kontakt zu IL-4 und IL-13, zu Immunglobulinkomplexen und Toll-Like-Rezeptor-Liganden oder zu IL-10 und Glukokortikoiden hervorgehen. Diese Makrophagen produzieren nur geringe Mengen an IL-12, dafür aber große Mengen an IL-10, IL-1ra, IL-1decoyR, CCL17, CCL22 und exprimieren hohe Level verschiedener Rezeptortypen (Mannose, Galactose, Scavenger). M2-Makrophagen sind Teil der TH2-Immunantwort, sie sind hinsichtlich der Antigenpräsentation den Makrophagen der „klassischen Aktivierung“ unterlegen und sie sezernieren eine Vielzahl proangiogener Faktoren, wodurch sie gute Induktoren der Angiogeneese sind. Sie haben zellverband-reparierende Funktionen und beteiligen sich an der Wundheilung, sie phagozytieren Abfallprodukte und üben durch die Suppression der M1-Makrophagen regulierten Funktionen immunmodulatorische Stimuli aus (Peddareddigari et al., 2010; Solinas G et al., 2009; Murdoch C, 2008).

Eine weitere Zellpopulation im Tumorstroma wird von den Fibroblasten gebildet. Diese, vom Mesenchym abstammenden Zellen synthetisieren den Großteil der extrazellulären Matrix und stellen die Hauptzellen des Bindegewebes dar (Li H et al., 2007). Ruhende Fibroblasten werden als Fibrozyten bezeichnet.

Fibroblasten migrieren in entzündetes Gewebe, um sich dort an den Prozessen der Inflammation und Wundheilung zu beteiligen. Fibroblasten spielen durch die Rekrutierung von Leukozyten zu dem Ort der Entzündung sowie Modulation deren Funktion im Rahmen der Inflammation eine bedeutende Rolle (Nazareth MR et al., 2007). Während ihrer Arbeit verändern sie ihren Phänotypen und werden „reaktiv“, in diesem Status werden sie als Myofibroblasten, Zellen mit Eigenschaften von sowohl Fibroblasten als auch glatten Muskelzellen bezeichnet (Egeblad M et al., 2005; Li H et al., 2007).

Extrazelluläre Matrix

Als extrazelluläre Matrix wird die Summe der Matrixkomponenten des extrazellulären Raums bezeichnet. Sie besteht aus von den Zellen des Extrazellularraums sezernierten und durch Interaktion immobilisierten Makromolekülen. Hierzu zählen eine faserige Komponente, bestehend aus Kollagenfibrillen und elastischen Fasern, und eine Grundsubstanzkomponente. Letztere ist eine kolloidale und transparente Substanz mit einem hohen Flüssigkeitsbindungspotenzial. Ihre Bestandteile werden sowohl von Fibroblasten synthetisiert als auch aus dem Blutplasma gewonnen.

In gesunden Geweben dient die extrazelluläre Matrix zum einen der Stabilisierung und Gewebsstrukturierung über Zell-Matrix-Verbindungen und zum anderen hat die extrazelluläre Matrix mit ihren Zellen Einfluss auf vielfältige Zellfunktionen wie zum Beispiel die Zellernährung, Immunabwehr und Zellreparatur. Dabei ist die extrazelluläre Matrix kein statisches Gerüst, sondern eine dynamische Einheit, die sowohl dank einer stetigen Proteinproduktion durch Fibroblasten als auch durch eine kontinuierliche Matrixproteindegradation durch Fibroblasten und andere Stromazellen sezernierte Matrix-Metallproteinasen (MMP) remodeliert wird (Li H et al., 2007).

Eingebettet in die extrazelluläre Matrix finden sich zur Zellversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, zum Abtransport der zellulären Stoffwechselprodukte und als Transportweg diverser Zellen die Gefäße.

Weiterhin befindet sich ein großer Pool von Stromazellen sezernierten Zytokinen in der extrazellulären Matrix. Diese, hauptsächlich von Leukozyten (Makrophagen und T-Helferzellen) und Tumorzellen sezernierten niedermolekularen Regulatorproteine dienen zur interzellulären Kommunikation und Steuerung diverser Prozesse im Tumorstroma. Ihren Effekt üben sie über die Bindung an hochspezifische Zytokinrezeptoren und den dadurch vermittelten Eingriff in intrazelluläre Signal-Transduktions-Kaskaden aus. Eine ihrer Hauptfunktionen ist dabei die positive wie auch negative Regulation von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen der diversen Zellen. In vivo übt ein einzelnes Zytokin seine Funktion dabei nicht solitär aus, sondern in einem komplexen Gemisch verschiedener Botenstoffe, die sowohl synergistische als auch inhibitorische Wirkungen entfalten können.

1.4.2 Zellfunktionsänderungen unter der Interaktion mit Tumorzellen

Zwischen den Zellen des Tumorstromas und den malignen Zellen herrscht eine rege Interaktion, welche sich im Laufe der Tumorprogression ebenso wie die Zusammensetzung dieses Tumormilieus verändert (Beachman DA et al., 2005). Tumorzellen sezernieren, um mit den sie umgebenden Stromazellen zu kommunizieren, zum einen lösliche Faktoren und zum anderen membran-gebundene Moleküle (Tang Y et al., 2004). Die gegenseitige Wechselbeziehung von Tumor- und Stromazellen beeinflusst dabei über die Regulation von Angiogenese, Suppression der organismuseigenen Immunabwehr, Modulation der extrazellulären Matrix sowie der Sekretion von Transmittern, welche wiederum zu Zellphänotypveränderungen und Veränderungen der Tumorstromazusammensetzung führen, in erheblichem Maße die Tumorprogression (Liotta LA et al., 2001; Proia DA et al., 2005) sowie die Potenz maligner Tumore (Stuelten CH et al., 2010).

Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, in den sie umgebenden Stromazellen genetische Alterationen zu induzieren, um sich ihrer zu bedienen. So zeigen sie die Fertigkeit, Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, in ihrem Phänotypen dahingehend zu verändern, dass diese anstatt ihrer eigentlichen Anti-Tumor-Funktion eine Pro-Tumor-Unterstützungsarbeit leisten, indem sie indirekt über ein für Tumorzellen verbessertes

Mikroklima und direkt über die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren eine Tumorprogression ermöglichen (Redente EF et al., 2007).

Tumorzellen rekrutieren Monozyten über das Monozyten Chemotaktische Protein (MCP)-1 und diverse weitere Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu sich (Coussens LM et al., 2002; Direkze NC et al., 2006; Solinas G et al., 2009) und unterstützen dort ihre Ausdifferenzierung zu Makrophagen. Einen Migrationsstimulus für Makrophagen stellen in Tumoren häufig vorhandene hypoxische Areale dar, in denen sich ein Großteil der Makrophagen auch aufhält. Die Hypoxie entsteht in Tumoren bei hohen metabolischen Ansprüchen der Tumorzellen durch funktionell und strukturell inadäquate Gefäßsysteme (Li H et al., 2007).

Diese Makrophagen, in der Regel als tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet, exprimieren unter Einfluss der malignen Zellen viele Gene, die für den M2 Phänotypen charakteristisch sind (Saccani A et al., 2006). In vielen Studien zeigt sich allerdings, dass TAM nicht pauschal auf einen Phänotyp festzulegen sind, sondern vielmehr entsprechend der Belange ihrer Umwelt im Mantel der am besten passenden Polarisation agieren und abhängig vom Tumorstadium unterschiedliche Phänotypen exprimieren können. M1-Makrophagen scheinen im Rahmen von chronischen Entzündungen, in denen das Potenzial zu neoplastischen Transformationen und damit zur Tumorentwicklung gegeben ist, vorherrschend zu sein. Im Laufe der Tumorprogression mit zunehmender Vaskularisation und beginnender Invasion scheint ein Klassenwechsel hin zu einem M2 Phänotypen stattzufinden (Biswas SK et al., 2008).

Diese tumor-assoziierten (M2) Makrophagen, welche etwa 50 % der Tumormasse darstellen, agieren in der Interaktion mit den malignen Zellen in vielerlei Hinsicht ganz im Sinne des sich entwickelnden Malignoms. Über die Sekretion verschiedener proangiogener Substanzen, wie VEGF, PDGF, TGF- β , IL-1 β und diverser Matrixmetallproteinase können sie Angiogenese induzieren und den Tumoren helfen, ihre metabolischen und nutritiven Bedürfnisse zu decken. Des Weiteren sezernieren TAM unter Einfluss der Tumor-Stroma-Interaktionen eine große Menge an verschiedenen Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen, über welche sie die Tumorzellinvasion fördern, immunsuppressiv wirken, strukturelle Veränderungen der EZM bedingen und die Metastasierungsbestrebungen des Tumors unterstützen (Kimura YN et al., 2007; Solinas G

et al., 2009; Kurahara H et al., 2011). Dabei steigt die Zahl der TAM im Tumorstroma im Laufe der Tumorprogression kontinuierlich an (Redente EF et al., 2007). Die intensive Kommunikation zwischen Tumorzellen und Makrophagen garantiert einen kontinuierlichen Prozess des EZM-Umbaus und der EZM-Erneuerung, welche in ihrem Zusammenspiel den malignen Zellen die Invasion in benachbartes Gewebe erleichtert und ihr Wachstum unterstützt. Eine wichtige Rolle spielen hierbei verschiedene Matrixmetall-Proteinasen (MMP), welche unter anderem von Makrophagen sezerniert werden (Li H et al., 2007). So unterstützen Makrophagen durch die Sekretion von unter anderem der MMP-9 die Migration und das Wachstum von sowohl Endothelzellen zur Angiogenese als auch die Tumorprogression (Robinson S-C et al., 2002).

Im Laufe der Karzinogenese kommt es im Rahmen der Tumor-Stroma-Interaktion auch in anderen Stromazellen zu einem Phänotypenwechsel. Tumorstromafibroblasten erfahren im Verlauf ebenfalls einen Phänotypenwechsel, welcher zu einem Funktionswandel der Fibroblasten führt. Anstatt die Tumorprogression zu verhindern, stellen diese aktivierten Zellen ihre Arbeit, ähnlich der TAM M2, in den Dienst der malignen Zellen. Welche Faktoren genau den Phänotypenswitch bedingen, ist bislang noch unklar. Stuelten et al. diskutieren 2010 aber die Möglichkeit eines tumorzell-induzierten Primings der Fibroblasten unter Einwirkung von TGF- β . Sowohl tumor-assoziierte Fibroblasten als auch Tumorzellen sezernieren in ihrem Interaktionsprozess diverse immunmodulierende Substanzen, darunter das Fibroblasten-sezernierte-Protein (FSP1), welches proangiogene Funktionen besitzt und in der Tumormetastasierung eine Rolle spielt (Egeblad M et al., 2005). Des Weiteren sezernieren tumor-assoziierte Fibroblasten ebenso wie Immunzellen und Tumorzellen die Tumorprogression unterstützendes TGF- β (Bhowmick NA et al., 2005; Direkze NC et al., 2006; Stuelten CH et al., 2010). TGF- β stimuliert das Wachstum maligner Zellen, erleichtert ihnen die Invasion in benachbartes Gewebe und schützt sie vor dem körpereigenen Immunsystem (Li H et al., 2007). Aus dem Tumorstroma stammendes TGF- β stimuliert Fibroblasten zur Sekretion von MMP-9, welche wiederum die Tumorzellmigration- und invasion zu fördern vermag. Hierzu fördert MMP-9 ihrerseits zum einen die Produktion von Wachstumsfaktoren wie TGF- β im Tumormilieu und sogt

zum anderen für eine Destruktion der extrazellulären Matrix und damit für verbesserte Wachstumsmöglichkeiten maligner Zellen.

Tumorzellverbände benötigen für ihr schnelles und exzessives Wachstum ein sie mit metabolischen und nutritiven Faktoren optimal versorgendes Klima. Um ihre Belange zu decken, schaffen sie sich ein komplexes Gefäßnetzwerk. Tumor-assoziierte Endothelzellen sezernieren dabei für den Tumor Wachstumsfaktoren, worauf der Tumor wiederum die Sezernation dieser Wachstumsfaktoren unterstützt. Die Angiogenese wird dabei hauptsächlich durch VEGF induziert, welches sowohl von den Tumorzellen selbst, als auch von Immunzellen und Fibroblasten aus dem Tumorstroma sezerniert wird. VEGF, dessen Hauptstimulus Hypoxie darstellt, bewirkt neben der Induktion von Angiogenese eine vermehrte Sekretion proangiogener Zytokine, ein Remodeling des Tumorstromas sowie die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen. Die neuen VEGF-induzierten Gefäße entstehen entweder durch Ausknospung bereits bestehender Gefäße oder durch die Rekrutierung von vaskulären Progenitorzellen und unterscheiden sich in ihrer Struktur und Hierarchie deutlich von normalen und gesunden Gefäßabschnitten. Ihre Verteilung und Aufzweigungen weichen von den normalen Mustern ab, sie sind fragiler und unter hohen Innendrücken sehr anfällig für Leckagen. Außerdem stimulieren sie selbst auch die Produktion von VEGF (Li H et al., 2007) und werden von den primären Tumorzellverbänden benötigt, um in entfernte Gewebe zu metastasieren (Direkze NC et al., 2006).

Für die Invasion in benachbartes Gewebe müssen Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, ihre Zell-Zellkontakte aufzuheben, da ihnen die Ausbreitung in das sie umgebende Gewebe ansonsten nicht möglich wäre. Um ihnen ihr Wachstum zu erleichtern, sezernieren diverse Tumorstromazellen, wie Makrophagen und Fibroblasten, unter dem Einfluss komplexer Tumor-Stroma-Interaktionen Matrix Metallproteinasen (MMP). Allen Familienmitgliedern der MMP zu eigen ist die Fähigkeit, Proteine der extrazellulären Matrix sowie der umgebenden Gewebsstrukturen zu hydrolysieren und damit natürliche Barrieren abzubauen. Auf diese Weise vermögen sie, maligne Zellen bei ihrer Invasion in benignes Nachbargewebe zu unterstützen (Tang Y et al., 2004; Li H et al., 2007).

2 Fragestellung

Jedes Jahr erkranken ungefähr 12 Millionen Menschen an einer malignen Neoplasie und ungefähr 7 Millionen Menschen sterben jedes Jahr aufgrund einer solchen Erkrankung. In Deutschland ist das Bronchialkarzinom das dritthäufigste aller Malignome und die Neoplasie mit der höchsten Mortalität. Aktuelle Therapien ermöglichen vielen Betroffenen eine Lebensverlängerung, aber in der Mehrzahl der Fälle keine Heilung.

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Interaktionsverhalten von Tumorzellen, am Beispiel von Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen (LLC1-Zellen) und von Tumorstromazellen am Beispiel von Makrophagen und Monozyten untersucht werden. Hierfür sollen sowohl die Zytokinexpressionsmuster unter gegenseitiger Interaktion als auch die Proliferationsraten der LLC1-Zellen unter dem Einfluss der Tumor-Stromazellen-Wechselbeziehungen untersucht werden.

In diversen Studien werden verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren anti-tumoröse Potenziale nachgewiesen. In einem zweiten Teil dieser Arbeit soll deshalb der Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf a) die LLC1-Zellen, b) die Makrophagen / Monozyten und c) den Interaktionsprozess der malignen und nicht malignen Zellen untersucht werden. Hierfür sollen ebenfalls Zytokinexpressionsanalysen sowie Proliferationsversuche durchgeführt werden.

Tumorstromazellen, welche ungefähr die Hälfte der Zellmasse eines Tumors ausmachen, und die Interaktion dieser mit den malignen Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression. Im Rahmen der wechselseitigen Kommunikation verschaffen sich Tumorzellen über gezielte Manipulationen von Immunzellen Verbündete, welche das maligne Zellwachstum fördern und unterstützen.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen weiteren Lichtstrahl in das noch immer in weiten Teilen im Dunklen liegende Tumormikroklima zu bringen, um die darin ablaufenden Interaktionen, vor allem in Hinblick auf therapeutische Optionen, besser verstehen zu können.

3 Material

3.1 Medien und Puffer

Zellkulturmedien

Für die Kultur von LLC1-Zellen sowie für die Kultur muriner Makrophagen und Monozyten wurde RPMI-1640 Medium (PAA Laboratories GmbH, Austria) unter Zusatz von 10 % bzw. 20 % fetalem Kälberserum (FCS) (Greiner bio one, Deutschland), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (0.1 mg/ml) (Gibco, Deutschland) verwendet.

Trypsin-Lösung

Die Lösung ausdifferenzierter adhärenter Makrophagen und Monozyten vom Zellkulturflaschenboden geschah mittels Verwendung EDTA-Trypsin-Lösung. Ebenfalls mussten am Flaschenboden adhärente LLC1-Tumorzellen für den Mediumwechsel und ihre anschließende Nutzung mittels EDTA-Trypsin-Lösung vom Flaschenboden gelöst werden. Dazu wurde Trypsin-Lösung 10x, welche mit PBS (Phosphate Buffered Saline) auf eine einfache Konzentration verdünnt wurde, benutzt.

Einfriermedium

7 Teile Kulturmedium RPMI 1640 dienten unter Zusatz von zwei Teilen FCS und einem Teil Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deutschland) als Einfriermedium.

Puffer zur Lyse von Erythrozyten

Zur Lyse von Erythrozyten wurde die mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnte „BD Pharm Lyse“ verwendet.

Propidiumiodid

Zur Differenzierung von vitalen und avitalen Zellen wurde Propidium Jodid in einer Konzentration von 0,2 µg/ml verwendet. Nur die Zellmembran von avitalen Zellen ist für dieses durchlässig und färbt diese so blau an.

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
250 ml Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Deutschland
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Pipettenaufsätze	Eppendorf, Deutschland
Pipettboy	IBS (Integra Biosciences), Schweiz
Pipetten für Pipettboy	BD Falcon, Becton Dickinson and Company, USA
Multipette	Eppendorf, Deutschland
Combitips	Eppendorf, Deutschland
15 und 50 ml Tubes	BD Falcon, Becton Dickinson and Company, USA
24-well Platten	BD Falcon, Becton Dickinson and Company, USA
Membranfilter	BD Falcon, Becton Dickinson and Company, USA
Culture Slides	BD Falcon, Becton Dickinson and Company, USA
96 Well Flachboden Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Deutschland
Kryotubes	Greiner Bio-One, Deutschland
Tubes	Roth GmbH, Deutschland
Iopromide	Schering, Deutschland
Dako Mounting Medium	Dako Cytomation Carpinteria, USA
Chloroform	Fluka, Sigma Aldrich, Deutschland
Isopropanol	Fluka, Sigma Aldrich, Deutschland
Ethanol	Stockmeier Chemie, Deutschland
6-well Platten	Costar, Deutschland
12-well Platten	Costar, Deutschland

Sterile Einmalpinzette	Seidel Medizin GmbH, Deutschland
Sterile Kompressen	Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Deutschland
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Deutschland
Zellscraper	Greiner Bio-One, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Deutschland
Deckgläschen für Haemocytometer	R. Langenbrinck Labor und Medizintechnik, Deutschland

3.3 Reagenzien, Zytokine und Antibiotika

Tabelle 2: Reagenzien, Zytokine und Antibiotika

Produkt	Hersteller
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Lipopolysaccharide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
rm-GMCSF	R+D Systems, USA
rm-MCSF	R+D Systems, USA
BD Pharm Lyse	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
PBS	PAA Laboratories GmbH, Austria
Aceton	Merck KGaA, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
Multi-Analyte Profiler ELISArray Kit	Bioscience Corporation, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics GmbH, Germany

TRIzol	Invitrogen, USA
--------	-----------------

3.4 Antikörper und Färbungen

Tabelle 3: Antikörper und Färbungen

Produkt	Hersteller	Aufgabe
rat anti mouse F4/80 antigen	MCA497G, AbD serotec	Oberflächenmarker für Makrophagen
rat anti mouse CD68	MCA1957, AbD serotec	Oberflächenmarker für Makrophagen
rat anti mouse MOMA-2	MCA 519G, AbD serotec	Oberflächenmarker für Makrophagen und Monozyten
Rat anti mouse/human CD11b antibody	MAB1387Z, Millipore Corporation	Oberflächenmarker für Monozyten
goat-anti-rat Alexa488-antibody	Invitrogen	Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper zur Detektion des jeweiligen Primärantikörpers
DAPI-Fluoreszenzfarbstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	Kernmarkierung
PKH-26	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	Rot fluoreszierender Zellmembranmarker
PKH-67	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	Grün fluoreszierender Zellmembranmarker

3.5 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Produkt	Hersteller
Zentrifuge	Hereaus Instruments, USA
Brutschrank	Heraeus Instruments, USA
Bench	Heraeus Instruments, USA
Lichtmikroskop	Leica Instruments, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Leica Instruments, Deutschland
Mikrozentrifuge	Heraeus, Deutschland
Vortex	Heidolph, Deutschland
ELISA Reader	Tecan GmbH, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Bosch, Deutschland
Tiefkühlschrank -20°C	Bosch, Deutschland
Tiefkühlschrank -80°C	Hereaus Instruments, USA
Wasserbad	GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland

3.6 Tiere

Wir arbeiteten mit 4 - 6 Wochen alten, 20 - 30g schweren weiblichen C57/BL6 (H-2b)-Mäusen. Diese wurden von Charles Rivers, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Haltung erfolgte unter pathogen-freien Bedingungen und nach den Richtlinien für Tierexperimente der Europäischen Gemeinschaft.

3.7 Tumorzelllinie

Die Lewis-Lungen-Karzinom-Zelllinie aus der musculus Lunge der C57/BL6 (H-2b)-Maus bezogen wir aus der „American Type Culture Collection“ (ATCC, Manassas, VA, USA). Die LLC1-Zellen werden aus der Lunge einer C57/BL6 Maus, welche durch die

Implantation eines primären Lewis-Lungen-Karzinoms einen Tumor trägt, gewonnen. Das Tumorpotenzial dieser Zellen ist als hoch, ihre Metastasierungsfähigkeit hingegen ist als gering anzusehen. Morphologisch treten LLC1-Zellen als abgerundete Zellen in Erscheinung. Sie wachsen in Zellkulturen zum Teil sowohl in der Suspension als auch adhärent auf den Kulturplatten, vornehmlich wachsen sie aber in multiplen Schichten übereinander, ohne tatsächlich konfluent zu werden. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37°C.

4 Methoden

4.1 Zellkulturarbeiten

4.1.1 Zellkultur von LLC1-Tumorzellen

LLC1-Tumorzellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (0.1mg/ml) bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

4.1.1.1 Passagieren von LLC1-Zellen

Die LLC1-Zellen wurden zur Gewährleistung eines optimalen Wachstums bei ausreichender Adhärenz und Dichte regelmäßig in etwa 2- bis 3- täglichen Abständen gesplittet. Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert. Zur Lösung der am Kulturflaschenboden adhärenter Zellen wurde Trypsin 1 % verwendet. Dazu wurden der Mediumüberstand aus den Kulturflaschen abpipettiert und die adhärenenten Zellen mit 6 ml Trypsin bedeckt. Die darauf folgende Inkubationszeit bei 37°C war zellspezifisch und betrug bei LLC1-Zellen ungefähr 1 Minute und bei Makrophagen und Monozyten ungefähr 8 Minuten. Die gelösten Zellen wurden nach Abspülen des Flaschenbodens mit der Trypsin-Zell-Suspension in dieser in einen mit 2 ml FCS vorbereiteten Tube gegeben. Der Flaschenboden wurde nochmals mit 10 ml Kulturmedium nachgespült und dieses Medium wurde ebenfalls zu den sich in FCS-Suspension befindenden Zellen gegeben. Die Zellen wurden als nächstes für 8 Minuten bei 1600 Umdrehungen pro Minute (RPM) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und spezifisch weiterverarbeitet.

4.1.1.2 Einfrieren und Auftauen von LLC1-Zellen

Für längerfristige Lagerungen von Zellen wurden diese eingefroren. Dazu wurden die Zellen in Pellets von etwa 10 - 50 x 10⁶ Zellen unterteilt und in einem Volumen von 500 µl

Einfriermedium aufgenommen. Die Temperatur betrug zum Zeitpunkt der Aufnahme in das eisgekühlte Einfriermedium ungefähr 0°C. Es folgte eine Kühlkette von einer Stunde Lagerung bei -20°C, 24 Stunden Lagerung bei -80°C und die langfristige Lagerung bei -130°C.

Für die erneute Nutzung eingefrorener Zellen wurden diese möglichst schnell mittels Schwenken in 37°C warmem Wasser aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden zentrifugiert, mit Kulturmedium gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in Kulturmedium aufgenommen. Die Tumorzellen wurden erst nach einem Generationswechsel ihrer Funktion zugeführt.

4.1.2 Isolation von murinem Knochenmark

C57/BL6 Mäuse wurden von Dr. Rajkumar Savai zu wissenschaftlichen Zwecken getötet. Den Tieren wurde von Dr. Rajkumar Savai beidseits Femur und Tibia entnommen, welche dann der Verfasserin dieser Arbeit übergeben wurden. Das Knochenmark wurde mittels Spülung der Knochen mit RPMI 1640 Kulturmedium unter Zusatz von Streptomycin (0,1mg/ml) und Penicillin (100U/ml) gewonnen. Es folgte zur Elimination nicht erwünschter Erythrozyten eine Erylyse (Savai R et al., 2005; Liu D et al., 2010). Hierzu wurden die Zellen in 2 ml BD Pharm Lyse aufgenommen, 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 1600 RPM für 8 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Zum Abschluss wurde die Zellsuspension noch zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Knochenmarkzellen in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von entsprechenden Wachstumsfaktoren kultiviert wurden.

4.1.2.1 Generation von Makrophagen aus murinen Knochenmarkzellen

Zur Gewinnung von Makrophagen wurde zu den in RPMI 1640-Kulturmedium unter Zusatz von 20 % FCS suspendierten Knochenmarkzellen an Tag 0 20ng/ml rm-MCSF hinzugefügt. Es folgte eine dreitägige Inkubation. An Tag 3 wurden 50 % des Kulturmediumüberstands unter Rückgewinnung der im Medium enthaltenden Zellen mittels Zentrifugation (8 Minuten, 1600 RPM) den Kulturflaschen entnommen. Die

entnommene Mediummenge wurde unter Zugabe der abzentrifugierten Zellen durch die gleiche Menge frischen Kulturmediums sowie entsprechender Wachstumsfaktoren ersetzt. Für die nächsten drei Tage wurden die Zellen erneut inkubiert. Am 5. Tag wurden zur Aktivierung der Makrophagen 50 % der Kulturschalen mit 10ng/µl LPS versetzt. An Tag 6 wurden die ausdifferenzierten Makrophagen durch Trypsinierung mittels Trypsin 1 % gewonnen. LPS stimulierte und nicht stimulierte Zellen gerieten dabei nicht miteinander in Kontakt (Lin H et al., 2001; Sinha S et al., 2008; Minami M et al., 2008).

4.1.2.2 *Generation von Monozyten aus murinen Knochenmarkzellen*

Den gewonnenen Knochenmarkzellen wurden an Tag 0 20ng/ml rm-GMCSF als Wachstumsfaktor hinzugesetzt. Nach 3 und 6 Tagen Inkubationszeit wurde ein wie oben beschriebener Medienwechsel durchgeführt. Entsprechend der Makrophagenaktivierung wurde an Tag 9 die Hälfte der Monozyten mit 10ng/µl LPS aktiviert. An Tag 10 wurden die Monozyten unter Verwendung von Trypsin 1 % abgeerntet. LPS stimulierte und nicht stimulierte Zellen gerieten dabei nicht miteinander in Kontakt (Chu XY et al., 2005).

4.2 Wachstum von LLC1-Zellen, Makrophagen und Monozyten unter Zusatz des Multikinaseinhibitors Sorafenib

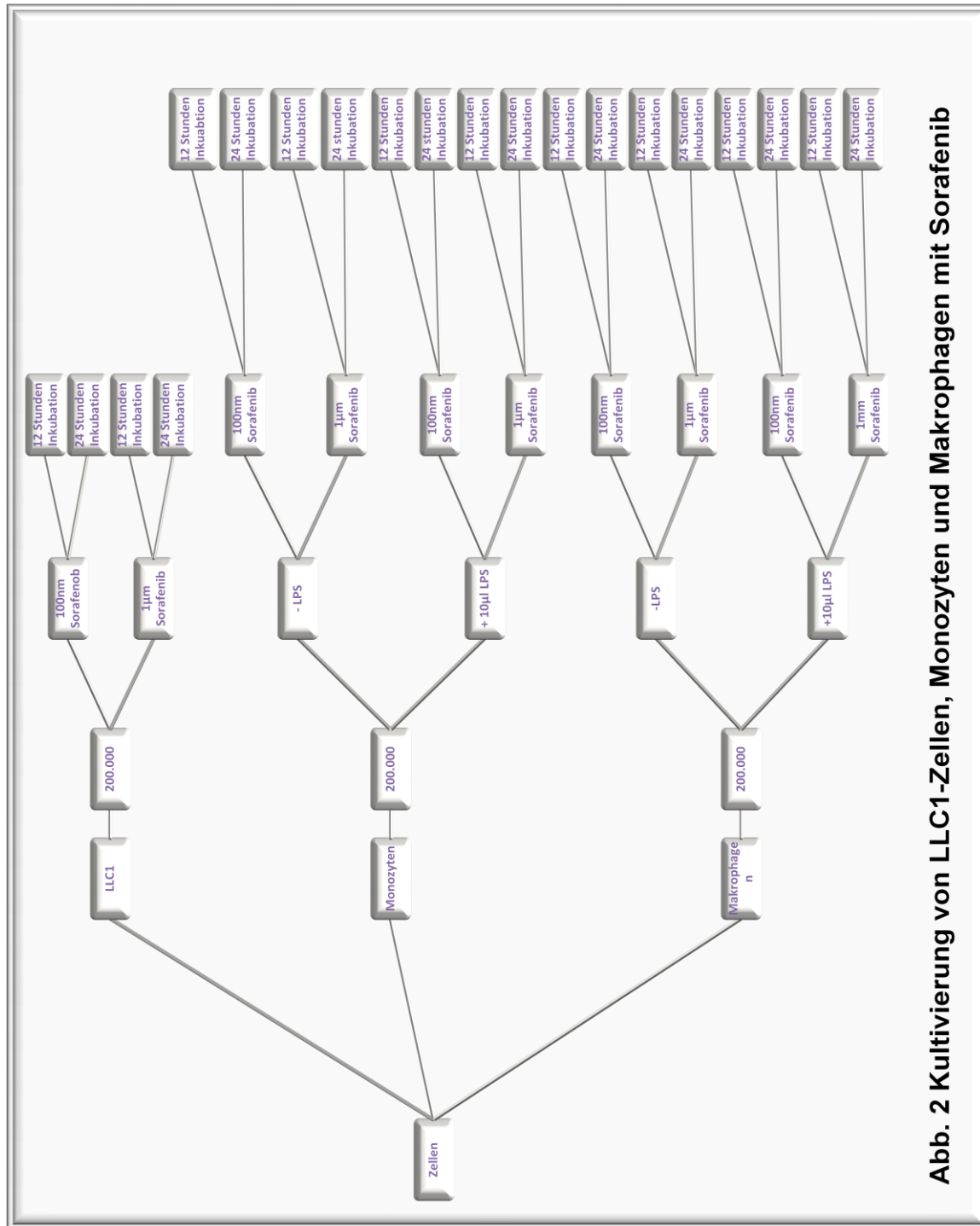


Abbildung 2: Kultivierung von LLC1-Zellen mit murinen Makrophagen / Monozyten.

Adhärente LLC1-Zellen wurden trypsiniert und gezählt. Jeweils 200.000 LLC1-Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in Petrischalen bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Die Makrophagen und Monozyten wurden einen Tag vor ihrer Ausdifferenzierung ebenfalls trypsiniert, gezählt und in einer Dichte von 200.000/10 ml in 10 ml Kulturmedium in Petrischalen angesiedelt. Jeweils die Hälfte der Makrophagen und Monozytenkulturen wurde mit 10ng/µl LPS aktiviert. Makrophagen und Monozyten wurden stets getrennt voneinander gehalten.

Einen Tag nach Aussäen der LLC1-Zellen wurde der erste Teil der LLC1-Zellkulturen mit 100nm Sorafenib und der zweite Teil der LLC1-Zellen mit 1µm Sorafenib versetzt. Den Kulturmedien aller Makrophagen und Monozyten wurden am Tag ihrer Ausdifferenzierung ebenfalls hälftig 100nm und hälftig 1µm Sorafenib zugefügt. Es folgte eine unterschiedlich lange Inkubation der Zellen von 12 und 24 Stunden. Zur Beendigung der Inkubation wurde das Medium abgenommen, für 10 Minuten bei einer Beschleunigung von 1000 g zentrifugiert, auf Eis gestellt und bei -80°C eingefroren. Die LLC1-Zellen wurden mit PBS gewaschen und unter Zugabe von TRIzol mittels Scrapens geerntet. Die Makrophagen und Monozyten wurden mit PBS gewaschen und unter Zugabe von TRIzol resuspendiert. Die erhaltenen Suspensionen wurden auf Eis gestellt und umgehend bei -80°C eingefroren.

Als Kontrollgruppen dienten LLC1-Zellkulturen sowie Monozyten- und Makrophagenpopulationen, welche für 12 und 24 Stunden unter RPMI-Kulturmedium kultiviert wurden.

4.3 Cokultivierung

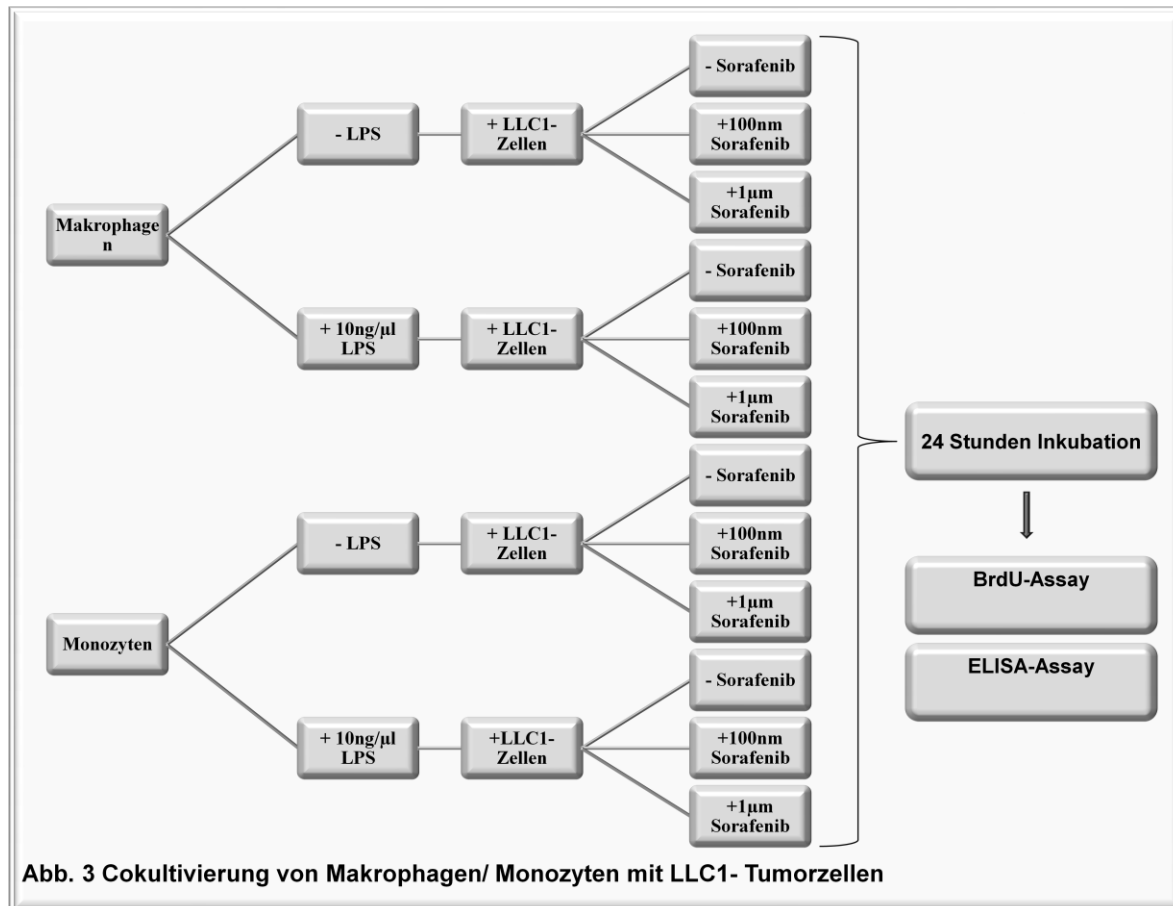


Abbildung 3: Cokultivierung von LLC1-Zellen mit murinen Makrophagen / Monozyten.

Alle Cokultivierungsversuche sowie die sich diesen anschließenden Analysen (BrdU, ELISA-Assay) sind dreimal unabhängig voneinander unter standardisierten Bedingungen wiederholt worden.

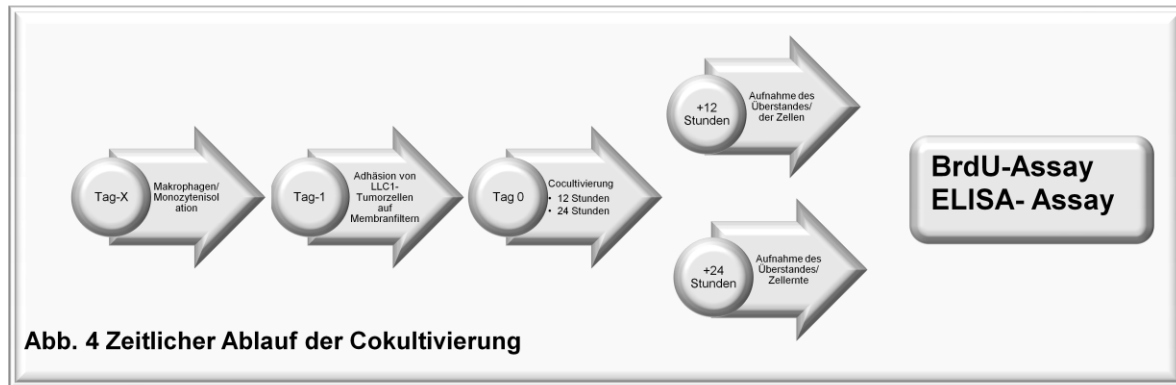


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Kokultivierung.

4.3.1 Adhärenzen von LLC1-Zellen auf Membranfiltern

Zuerst wurden sich in Kultur befindende LLC1-Tumorzellen trypsiniert, gewaschen, unter dem Lichtmikroskop gezählt und in Kulturmedium resuspendiert. 12 Membranfilter wurden unter sterilen Bedingungen “auf dem Kopf stehend” mit nach oben zeigenden Membranen in die einzelnen Wells einer 12-well-Platte gestellt. Auf diese Membranen wurden 50.000 LLC1-Tumorzellen in ihrer Kulturmediumsuspension in 80 µl/Membran gegeben.

Die Platten wurden steril abgedeckt und für eine Zeit von 2 Stunden bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit adhärten die LLC1-Zellen auf den Membranfiltern. In eine 24-well-Platte wurden 500 µl

frisches Kulturmedium/well vorgelegt. In jedes dieser vorbereiteten Wells wurde mittels steriler Pinzette ein mit LLC1-Zellen bestückter Membranfilter eingehängt, sodass die Membranflächen mit ihren Zellen nach unten in das Kulturmedium eintauchten. In jeden nach oben offenen Membranfilter wurden 100 µl Kulturmedium gegeben, damit die LLC1-Zellen nicht austrockneten. Die 24-well-Platten wurden mit einem Deckel steril verschlossen und es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C.

4.3.2 Interaktion von LLC1-Tumorzellen mit Makrophagen sowie mit Monozyten

Die Interaktion von LLC1-Tumorzellen mit Makrophagen und Monozyten begann an Tag 0. Makrophagen und Monozyten wurden dabei stets getrennt voneinander gehalten, es kam also zu keiner Vermischung der beiden Zelllinien.

Das die Makrophagen und Monozyten bedeckende Kulturmedium wurde abgenommen und für 20 Minuten bei einer Beschleunigung von 1000 g zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde abgenommen, auf Eis gestellt und anschließend bei -80°C eingefroren.

Die ausdifferenzierten Makrophagen und Monozyten wurden trypsiniert, gewaschen, in Kulturmedium resuspendiert und unter dem Lichtmikroskop gezählt.

In jedes Well einer 24-well-Platte wurden 500 µl Zellsuspension mit Zellen in einer Konzentration von 200.000 Zellen/well unter Zugabe der spezifischen Wachstumsfaktoren gegeben. Die steril abgedeckten Platten wurden anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um den Makrophagen und Monozyten Zeit zu geben, am Plattenboden zu adhären.

Während dieser Zeit wurden die am vorherigen Tage vorbereiteten LLC1-Membranfilter unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich ihrer Zelldichte und Zelladhärenz untersucht. Membranfilter mit einer ungenügenden LLC1-Zelldichte oder einer ungenügenden Zelladhärenz wurden verworfen.

Im Anschluss wurden die LLC1-Membranfilter in die mit den Makrophagen und Monozyten bestückten 24-well-Platten eingehängt. In jede Membranfilteröffnung wurden 100 µl Medium unter Zusatz der entsprechenden Wachstumsfaktoren gegeben. Es folgte eine unterschiedlich lange Inkubationszeit von 12 und 24 Stunden (Cakarova L et al., 2009).

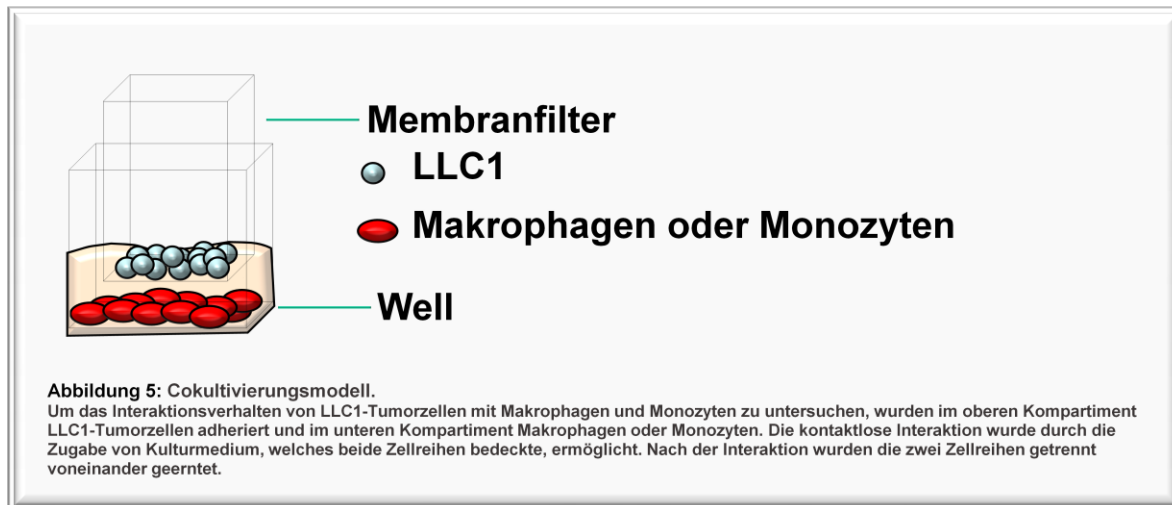


Abbildung 5: Kokultivierungsmodell.

4.3.3 Ernte der LLC1-Zellen

In eine 24-well-Platte wurden 500 µl Trypsin/well vorgelegt. Die LLC1-Membranfilter wurden mit sterilen Pinzetten den Interaktionsplatten entnommen und zum Waschen in Kulturmedium geschwenkt. Zum Abrinnen des Mediums wurden die Membranfilter mit nach oben zeigender Membran kurzzeitig auf sterilen Kompressen abgestellt. Anschließend wurden die Membranfilter mit nach unten zeigender Membran in die trypsinhaltigen Wells der 24-well-Platten eingehängt. Die Membranfilter mit den LLC1-Zellen verblieben für ungefähr 2 Minuten in der Trypsinlösung. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Am Ende der Inkubationszeit wurde, zur Terminierung der Trypsinwirkung, in jedes well 500 µl FCS-haltiges Kulturmedium gegeben. Mit dieser Trypsin-Kulturmedium-Suspension wurde jede Membranfiltermembran mehrfach zur Lösung der LLC1-Zellen abgespült. Die Zellsuspension wurde aufgefangen und bei 1600 RPM für 8 Minuten zentrifugiert. Das LLC1-Zellpellet wurde mit 2 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in TRIzol aufgenommen. Die TRIzol-Menge war abhängig von der Zellpelletgröße. Die TRIzolsuspension wurde umgehend auf Eis gestellt und bei -80°C eingefroren. Die Kontrollgruppe wurde von nicht an der Kokultivierung beteiligten LLC1-Zellen gebildet.

4.3.4 Aufnahme des Überstands

Das Interaktionsmedium wurde den einzelnen Wells entnommen und für 10 Minuten mit einer Beschleunigung von 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, auf Eis gestellt und direkt bei -80°C eingefroren. Als Kontrollgruppe dienten Kulturüberstände von LLC1-Zellpopulationen sowie Makrophagen- und Monozytenkulturen, welche für 12 und 24 Stunden mit RPMI-Kulturmedium inkubiert wurden.

4.3.5 Ernte der Makrophagen und Monozyten

Die adhärennten Makrophagen und Monozyten wurden in ihren Wells mit jeweils 500 µl Trypsin/well überschichtet. Die Böden jedes Wells wurden zügig mehrfach mit der Trypsinlösung abgespült, um noch adhärennte Makrophagen und Monozyten vom Boden zu lösen. Direkt im Anschluss wurden 200 µl FCS-haltiges Kulturmedium in jedes well gegeben. Die Zellsuspensionen wurden aufgenommen, zentrifugiert, mit 2 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die gewaschenen Zellpellets wurden in TRIzol aufgenommen. Die TRIzolmenge richtete sich nach der Größe der Zellpellets. Die TRIzolsuspension wurde auf Eis gestellt und umgehend bei -80°C eingefroren.

Als Kontrollgruppen fungierten unter RPMI-Kulturmedium inkubierte Makrophagen und Monozyten.

4.3.6 Interaktion von LLC1-Tumorzellen mit Makrophagen und LLC1-Tumorzellen mit Monozyten unter der Einwirkung von Sorafenib

In einer weiteren Versuchsreihe wurde den miteinander interagierenden LLC1-Zellen und Makrophagen / Monozyten an Tag 0 der Interaktion der Multikinaseinhibitors Sorafenib in den Konzentrationen 1µm und 100nm hinzugefügt. Das Sorafenib wurde mit Beginn der Zusammenführung der zwei verschiedenen Zellreihen zusätzlich zu dem Kulturmedium in jedes Interaktionswell und in jeden Membranfilter gegeben. Der restliche Versuchsaufbau und die Handhabung unterschieden sich nicht von den nicht medikamentös beeinflussten Versuchen und verliefen analog.

4.3.7 Funktionelle Zellkulturversuche

4.3.7.1 *ELISA*

Für die Messung der Zytokinexkretion in den Cokultivierungsversuchen wurde ein ELISA-Antibody-capture-assay verwendet. Hiermit wurden die Zytokinlevel von IL-1A, IL-1B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GCSF und GMCSF der einzelnen Proben gemessen. Kulturmedien von LLC1-Zellen, Makrophagen- und Monozytenpopulationen dienten als Kontrollgruppen. Die Arbeiten mit dem Assay wurden entsprechend der Leitlinien des Produkt-Herstellers ausgeführt.

Die Konzentrationen der unter Lichtschutz gehaltenen Proben wurden spektrometrisch bei 450 Nanometer gemessen. Die typischen Absorptionswerte lagen zwischen 0,00 bis 2,50.

4.3.7.2 *BrdU-Assay*

Zur Messung des Proliferationspotenzials von LLC1-Zellen, Makrophagen und Monozyten unter verschiedenen Bedingungen wurde ein BrdU-Assay genutzt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 96-well-Platten in einer Dichte von 5.000 Zellen/well kultiviert. Die Ausführung des Assays erfolgte nach Anleitung der Herstellerangaben.

Es wurde das Proliferationsverhalten von LLC1-Tumorzellen unter konditioniertem Medium aus den Cokultivierungsversuchen und unter Kulturmedium mit Sorafenibzusatz sowie unter RPMI-Kulturmedium als Kontrollgruppe untersucht. Des Weiteren wurden Makrophagen und Monozyten hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens unter folgenden Bedingungen untersucht: Medium aus den Cokultivierungsversuchen, Kulturmedium mit Sorafenibzusatz sowie RPMI-Kulturmedium als Kontrollgruppe. Mittels Absorption der Proben bei 370 Nanometer und einer Referenzwellenlänge von 492 Nanometer wurde die Konzentration der Proben spektrometrisch bestimmt.

4.4 Molekularbiologische Arbeiten

4.4.1 Immunzytochemie

4.4.1.1 Oberflächenfärbung von Makrophagen und Monozyten

Zur immunzytochemischen Charakterisierung der Makrophagen und Monozyten wurden diese am Tag ihrer Ausdifferenzierung trypsiniert, mit PBS 1 % gewaschen und anschließend gezählt. Danach wurden die Makrophagen und Monozyten, jeweils nach Arten getrennt voneinander, in einer Dichte von 100.000 Zellen/well in 300 µl RPMI 1640 Kulturmedium auf Chamberslides ausgesät. Anschließend wurden die Chamberslides samt der sich auf ihnen befindenden Zellen für 20 Minuten bei 1600 RPM zentrifugiert.

Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Zellen auf den Chamberslides gewaschen. Hierzu wurde der Überstand abgenommen und durch 400 µl PBS/well ersetzt. Eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur schloss sich an. Das PBS wurde danach verworfen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 400 µl/well eines 1:1 Aceton / Methanolgemisches für 30 Minuten bei -22°C inkubiert.

Im Anschluss wurde das Aceton / Methanolgemisch abgenommen und die Zellen wurden 2-mal mit 400 µl PBS/well bei Raumtemperatur und jeweils 5-minütiger Inkubationszeit gewaschen. Das PBS wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zur Blockierung mit 250 µl/well BSA 5 % überschichtet. Es folgte eine 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Daran schloss sich die Färbung der Immunzellen mit dem Primärantikörper an. Die Antikörper wurden entsprechend der Immunzelltypen ausgesucht. Für die Makrophagen verwendeten wir F4/80, CD68 sowie MOMA-2. Die Monozyten wurden mit CD11b und MOMA-2 als ersten Antikörper gefärbt. In der Konzentration von 1:200 wurden die Antikörper in PBS 1 % gelöst und in 200 µl/well auf die Zellen gegeben. Es folgte eine nächtliche Inkubation der Zellen mit ihren spezifischen Antikörpern bei 4°C.

An dem folgenden Tag wurden die Makrophagen und Monozyten nach 10-minütigem Aufwärmen bei Raumtemperatur und Verwerfen des ersten Antikörpers dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde dieses verworfen. Es folgte die Färbung mit dem

Sekundärantikörper. Hierzu verwendeten wir für sowohl CD11b, MOMA-2, F4/80 als auch CD68 einen goat-anti-rat Alexa488-antibody. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:1.000 in 200 µl/well auf die Makrophagen und Monozyten gegeben und lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Der zweite Antikörper wurde verworfen und die Zellen wurden dreimal mit 400 µl/well PBS gewaschen und jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Das PBS wurde verworfen. Anschließend wurde zur Kernfärbung auf die Makrophagen und Monozyten 200 µl/well DAPI-Fluoreszenzfarbstoff in der Konzentration 1:100 geben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde verworfen und die Makrophagen und Monozyten wurden mit PBS gewaschen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Das PBS wurde verworfen. Die Kammern der Chamberslides wurden von den Objektträgern abgetrennt. Zur Fixierung der Färbung wurde ein Tropfen Mounting Medium auf jede Kammer geben, um die Immunzellen unter dem Mounting Medium mit einem Deckplättchen zu fixieren. Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

4.4.1.2 Oberflächenfärbung von LLC1-Zellen

Zur Färbung der LLC1-Zellen verwendeten wir PKH-26-G1 rot und PKH-67-G1 grün. Zunächst wurden 5×10^6 LLC1-Zellen in 500 µl Diluent-Lösung resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit 500 µl einer Lösung, bestehend aus 4 µl/ml PKH-26 oder 16 µl/ml PKH-67, in Diluent gemischt. Die Suspensionen wurden für 1 Minute inkubiert, anschließend wurde 1 ml bovines Serum Albumin hinzugefügt und abermals 1 Minute inkubiert. Dieser Vorgang erfolgte unter Lichtabschluss. Im nächsten Schritt wurde den Zellsuspensionen 2 ml RPMI-1640 hinzugefügt und anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Mischung für 10 Minuten bei 400 g und 25°C. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte.

4.4.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die korrekte Generation von Makrophagen und Monozyten aus murinem Knochenmark wurde nach immunzytochemischer Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop geprüft. Makrophagen und Monozyten emittierten grünes Licht und ihre Kerne blaues Licht. Die LLC1-Zellen stellten sich entsprechend des verwendeten Farbstoffs rot oder grün dar.

4.5 Statistik

Alle Graphen und Statistiken wurden unter Nutzung von GraphPad 5 (San Diego California USA) angefertigt. Die Datenanalysen wurden unter Zuhilfenahme des ANOVA one way Tests erstellt. Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler dargestellt. Statistische Signifikanz wurde angesehen bei einem p-Wert $< 0,05$. Es gelten $* \leq 0,05$ und $** \leq 0,01$ und $*** \leq 0,001$.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung muriner Makrophagen und Monozyten sowie muriner Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen

Nach der Isolation muriner Knochenmarkzellen wurden aus diesen Makrophagen und Monozyten generiert. Zur Qualitätsüberwachung wurden die auf diese Weise gewonnenen Makrophagen und Monozyten mit zellspezifischen Antikörpern gefärbt und anschließend in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Zur Färbung der Makrophagen wurden die Oberflächenantikörper F4/80, CD68 sowie MOMA-2 verwendet.

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt in Abbildung 6 die grün angefärbten Makrophagen sowie in den Abbildungen 6B, 6D, 6F und 6H zusätzlich die mittels DAPI angefärbten Zellkerne, welche blau zur Darstellung kommen. Mit unserer Methode ist es demnach möglich, Makrophagen mit einem hohen Reinheitsgehalt zu generieren, da alle Makrophagen in den unterschiedlichen Färbungen für die jeweiligen Marker positiv zur Darstellung kamen.

Zur Charakterisierung der Monozyten wurden die Fluoreszenzoberflächenmarker CD11b und MOMA-2 verwendet.

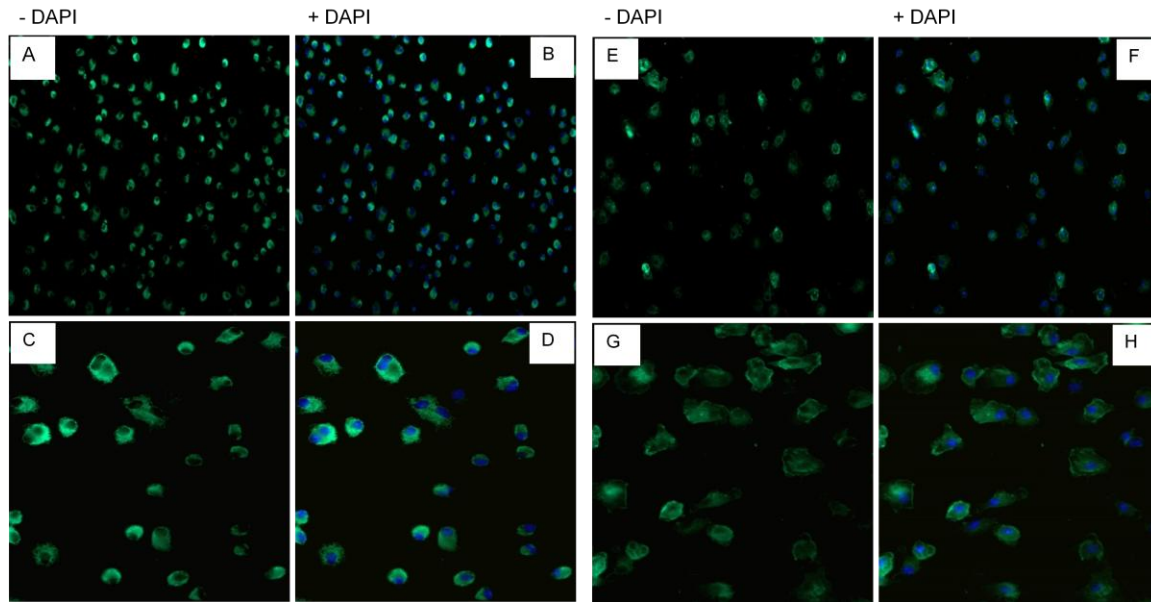


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Makrophagenmorphologie.

Abb. 6A-6D: Die Makrophagen wurden mit dem Membranantikörper CD68 markiert, in den Abb. 6B und 6D wurden zusätzlich die Zellkerne mit dem Kernfluoreszenzmarker DAPI angefärbt. Abb. 6A und 6B wurden in 20-facher Vergrößerung und die Abbildungen 6C und 6D in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Abb. 6E-6H: Zur Darstellung kommen Makrophagen, bei welchen das Membranantigen F4/80 mit einem gekoppelten Antikörper angefärbt wurde. In den Abb. 6F und 6H zeigen sich zusätzlich die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbten Zellkerne. Abb. 6E und 6F zeigen die Makrophagen in 20-facher Vergrößerung und die Abbildungen 6G und 6H zeigen dieselben Zellen in 40-facher Vergrößerung.

Die Abbildung 7 zeigt in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die Morphologie von grün angefärbten Monozyten. Im Gegensatz zu den Makrophagen zeigten die Monozyten in der Färbung mit CD68 keine positive Reaktion, womit wir eine potenzielle Makrophagenfehlgeneration ausschließen konnten. Die Abbildungen 7B, 7D, 7F und 7H zeigen weiterhin durch DAPI blau angefärbte Monozytenzellkerne.

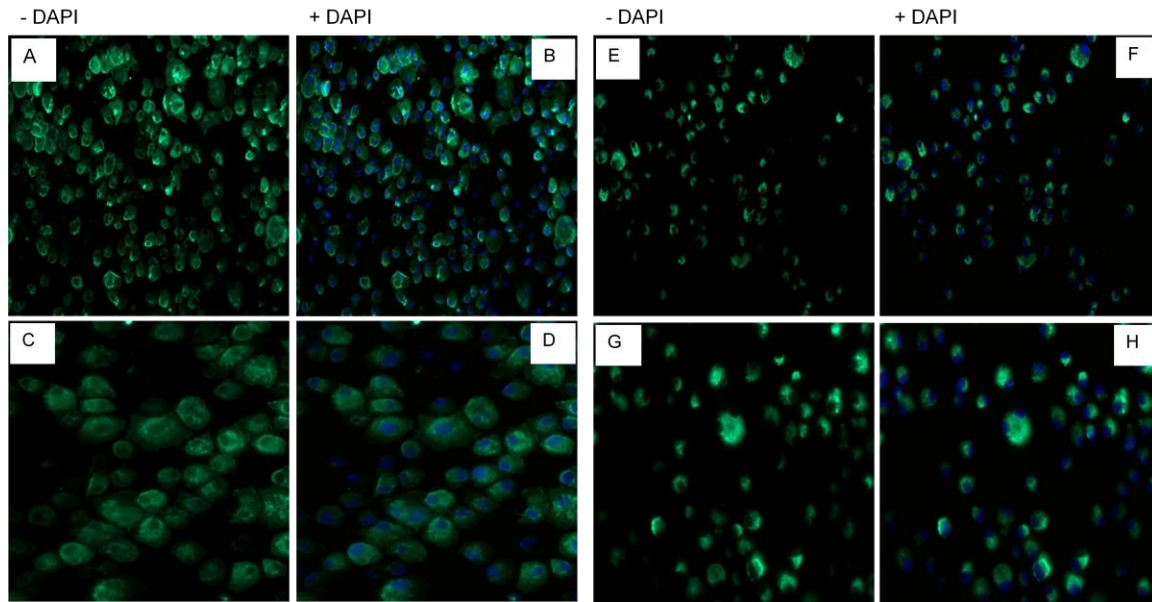


Abbildung 7: Morphologie der Monozyten. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung.

Abb. 7A-7D: Zur Färbung der Monozyten wurde das Membranantigen CD11b mit einem gekoppelten Antikörper markiert, in den Abb. 7B und 7D kommen zusätzlich die mittels des Kernfluoreszenzmarkers DAPI blau angefärbten Zellkerne zur Darstellung. Die Abb. 7A und 7B zeigen die Monozyten in 20-facher Vergrößerung und in den Abbildungen 7C und 7D sind diese in 40-facher Vergrößerung dargestellt.

Abb. 7E-7H: Zur Darstellung kommen Monozyten, bei welchen das Membranantigen MOMA-2 mittels eines gekoppelten Antikörpers markiert wurde. In den Abb. 7F und 7H wurden zusätzlich die Zellkerne mit dem Kernfluoreszenzmarker DAPI angefärbt. Abb. 7E und 7F bilden die Monozyten in 20-facher Vergrößerung ab und die Abbildungen 7G und 7H zeigen dieselben Zellen in 40-facher Vergrößerung.

Die LLC1-Tumorzellen wurden mittels der fluoreszierenden Membranfarbstoffe PKH-26 und PKH-67 angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die LLC1-Zellen in den Abbildungen 8A und 8B als durch PKH-26 markierte Zellen in roter Farbe. In den Abbildungen 8C und 8D kommen die LLC1-Tumorzellen durch die Verwendung des Membranfarbstoffes PKH-67 als grün angefärbte Zellen zur Darstellung.

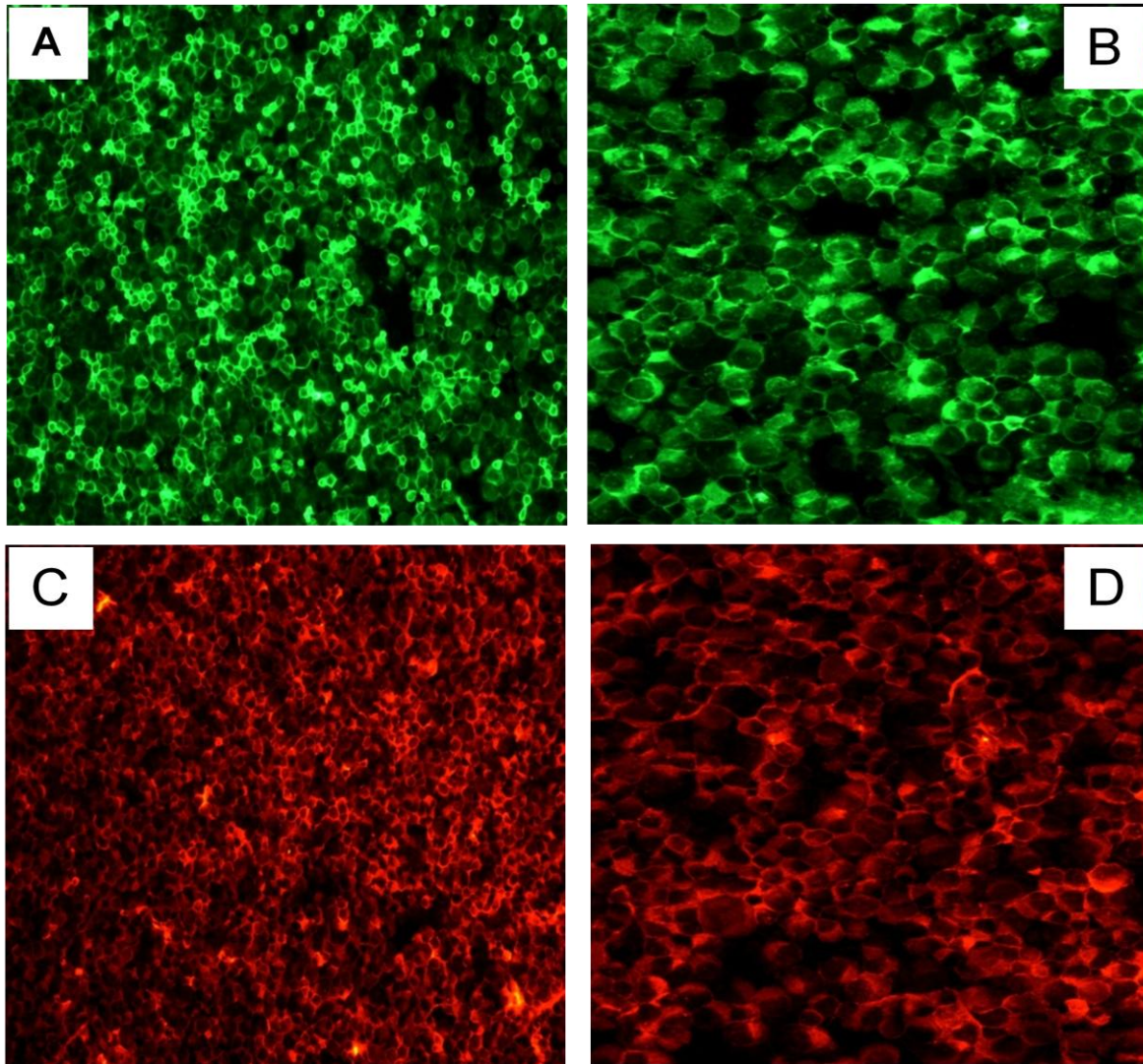


Abbildung 8: Morphologie der Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen.

Die Abb. 8A zeigt mit dem Membranfluoreszenzfarbstoff PKH 67 angefärbte LLC1-Zellen in einer 10-fachen Vergrößerung. In der Abb. 8B sind dieselben Zellen in 20-facher Vergrößerung dargestellt.

Abb. 8C: LLC1-Zellen wurden mit dem Membranfluoreszenzfarbstoff PKH 26 angefärbt und in einer 10-fachen Vergrößerung dargestellt. Die Abb. 8D zeigt dieselben Zellen in einer 20-fachen Vergrößerung.

5.2 Der Effekt konditionierter Medien auf das Proliferationsverhalten von LLC1-Tumorzellen

Um die Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von LLC1-Zellen durch Interaktionsprodukte aus der Interaktion von LLC1-Zellen und Makrophagen / Monozyten

zu untersuchen, wurden aus murinem Knochenmark gewonnene Makrophagen und Monozyten, getrennt voneinander, jeweils mit LLC1-Tumorzellen kokultiviert. Nach definierten Zeitpunkten von 12 und 24 Stunden wurde die Interaktion beendet und sowohl die konditionierten Medien als auch die unterschiedlichen Zellreihen wurden voneinander getrennt und asserviert (siehe hierzu: Abbildung 2: Kultivierung von LLC1-Zellen mit murinen Makrophagen / Monozyten, Methodenteil Punkt 4.2).

Die konditionierten Medien dienten der Untersuchung des Proliferationsverhaltens von LLC1-Tumorzellen unter diesen Medien im Vergleich zu dem LLC1-Zellwachstum unter unbehandelten Zellkulturmedien (RPMI, 20 % FCS, 0,1mg/ml P/S), welche als Kontrollgruppen dienten.

Abbildung 9A zeigt eine signifikante Zunahme der LLC1-Tumorzellproliferation nach sowohl einer 12-stündigen als auch 24-stündigen Inkubationszeit der LLC1-Tumorzellen mit den makrophagenkonditionierten Medien im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei welchen LLC1-Zellen mit reinem Kulturmedium für 12 und 24 Stunden inkubiert wurden. Ein sehr ähnliches Proliferationsverhalten hierzu zeigten die LLC1-Tumorzellen unter den konditionierten Medien LPS aktivierter Makrophagen im Vergleich zu der LPS-haltigen Kontrollgruppe.

Ebenso wiesen die LLC1-Tumorzellen ein signifikant gesteigertes Proliferationsverhalten unter der Inkubation mit monozytenkonditionierten Medien im Kontrollgruppenvergleich sowohl nach 12 Stunden als auch nach 24 Stunden Inkubationszeit auf. Die Kultivierung von LLC1-Zellen mit konditionierten Medien LPS aktivierter Monozyten führte ebenso zu einer gesteigerten Proliferation der LLC1-Zellen im Vergleich zu der Inkubation von LLC1-Zellen mit unkonditionierten Medien, welchem ebenfalls LPS zugefügt worden war (Abb. 9B).

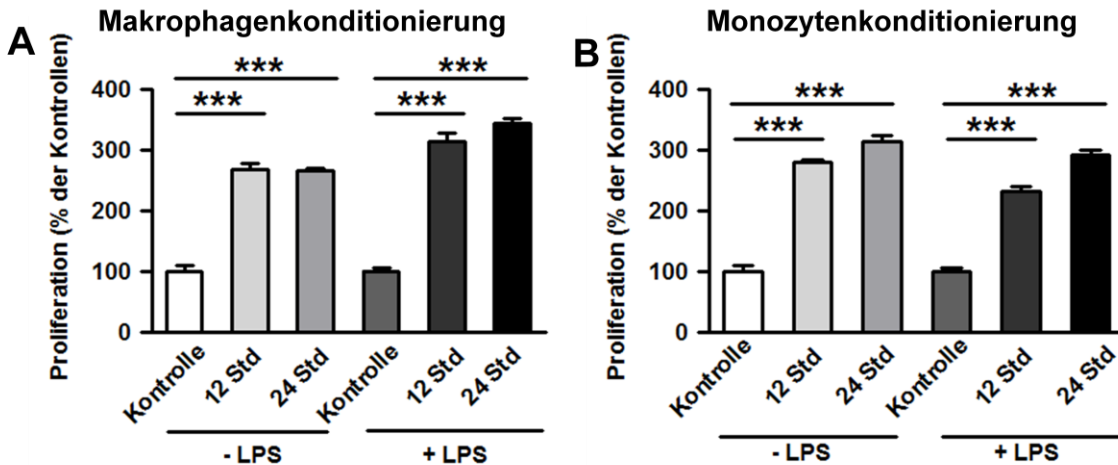


Abbildung 9: Proliferationsverhalten von LLC1-Tumorzellen.

Abb. 9A-9B: Murinem Knochenmark entstammende Makrophagen und Monozyten wurden mit Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen für 12 Stunden und 24 Stunden kokultiviert. Die konditionierten Medien wurden nach Beendigung der Kokultivierungszeiten aufgenommen und das Proliferationsverhalten von Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen wurde unter diesen Medien mittels BrdU-Proliferations-Assay untersucht. Als Kontrolle dienten LLC1-Zellen, welche unter LLC1-Zellkulturmedium (RPMI, 20 % FCS, 0,1mg/ml P/S, +/- LPS) für 12 Stunden und 24 Stunden inkubiert wurden.

Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3 Das Zytokinexpressionsverhalten von LLC1-Tumorzellen und Monozyten / Makrophagen in Kokultivierung

Der Einfluss des Interaktionsprozesses von LLC1-Zellen mit Makrophagen / Monozyten auf das Zytokinexpressionsmuster dieser Zellreihen sollte in diesem Versuch untersucht werden. Dazu wurden die Medien der Kokultivierungsversuche von murinen Makrophagen mit LLC1-Tumorzellen sowie von murinen Monozyten mit LLC1-Zellen nach Beendigung einer Interaktionszeit von 12 und 24 Stunden hinsichtlich ihres Zytokinexpressionsmusters untersucht. Als Kontrollgruppen dienten Makrophagen- und Monozytenmedien, welche am Tag der Ausdifferenzierung von den Makrophagen und Monozyten abgenommen und asserviert wurden. Die Makrophagen- und Monozytenmedien, die als Kontrollgruppen für die LPS-haltigen konditionierten Medien dienten, enthielten ebenfalls –aus der Makrophagen- und Monozytenaktivierung- LPS. Die konditionierten Medien aus der Kokultivierung von Makrophagen mit LLC1-Tumorzellen wiesen eine signifikante Steigerung der GCSF-Expression nach sowohl 12 Stunden als auch nach 24 Stunden auf.

Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Steigerung der IL-6 Produktion nach einer 24-stündigen Inkubationszeit.

Eine deutliche Sekretionsratensteigerung für IL-1A, IL-4, IL-10 und IL-17 zeigten jene Medien, welche aus der Interaktion von LLC1-Zellen mit Makrophagen stammten, die vor und während der Cokultivierungszeit mit LPS aktiviert wurden. Die Menge des sezernierten IL-6 zeigte ebenfalls eine deutliche Zunahme in den Cokultivierungsmedien, allerdings ohne statistische Signifikanz aufzuweisen.

Im Gegensatz hierzu veränderten sich die Konzentrationen von IL-1B, IL-2, IL-5, IL-12, IL-13 und GMCSF in Anwesenheit der konditionierten Medien im Vergleich zu den Kontrollgruppen, welche von Makrophagenmedien (+/-LPS) gebildet wurden, in keiner der beiden Versuchsgruppen signifikant (Abb. 10).

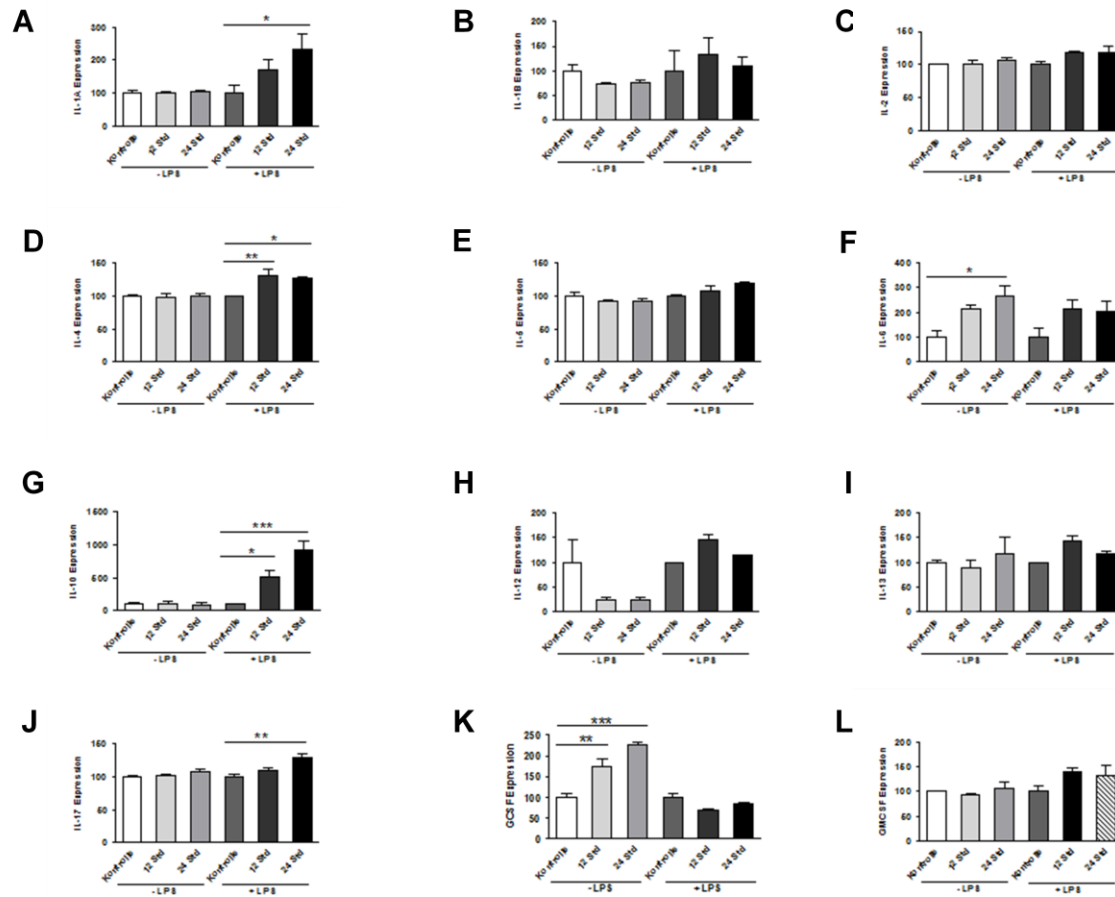


Abbildung 10: Makrophagen-LLC1-Zytokinexpressionsmuster.

Abb. 10A-10L: Für einen Zeitraum von 12 und 24 Stunden wurden murine Makrophagen mit murinen Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen kokultiviert. Die konditionierten Medien wurden nach Beendigung der Kokultivierungszeiten aufgenommen und das Zytokinexpressionsmuster der Makrophagen und LLC1-Zellen wurde in diesen Medien mittels ELISA-Assay untersucht. Als Kontrollgruppen dienten Makrophagenmedien (RPMI, 20 % FCS, 0,1mg/ml P/S, 20ng/ml MCSF, +/- LPS), welche an dem Tag der Ausdifferenzierung von diesen abgenommen und asserviert wurden.

Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abbildung 11 stellt die Zytokinexpressionsrate der Kokultivierungsmedien von Monozyten mit LLC1-Tumorzellen dar. Hier zeigte sich eine signifikante Steigerung der IL-5-Konzentration in den konditionierten und LPS-haltigen Medien nach einer 24-stündigen Interaktionszeit im Kontrollgruppenvergleich. Einen Sekretionssteigerungstrend zeigten sowohl die LPS-haltigen wie auch die LPS-freien Kokultivierungsmedien für folgende Interleukine: IL-1A, IL-1B und IL-6 ebenso wie die LPS-freien Interaktionsmedien für IL-10, IL-12 und GCSF.

Die Expression von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GCSF und GM-CSF zeigte unter Cokultivierungsbedingungen in beiden Gruppen und zu beiden Zeitpunkten keine deutlichen Veränderungen.

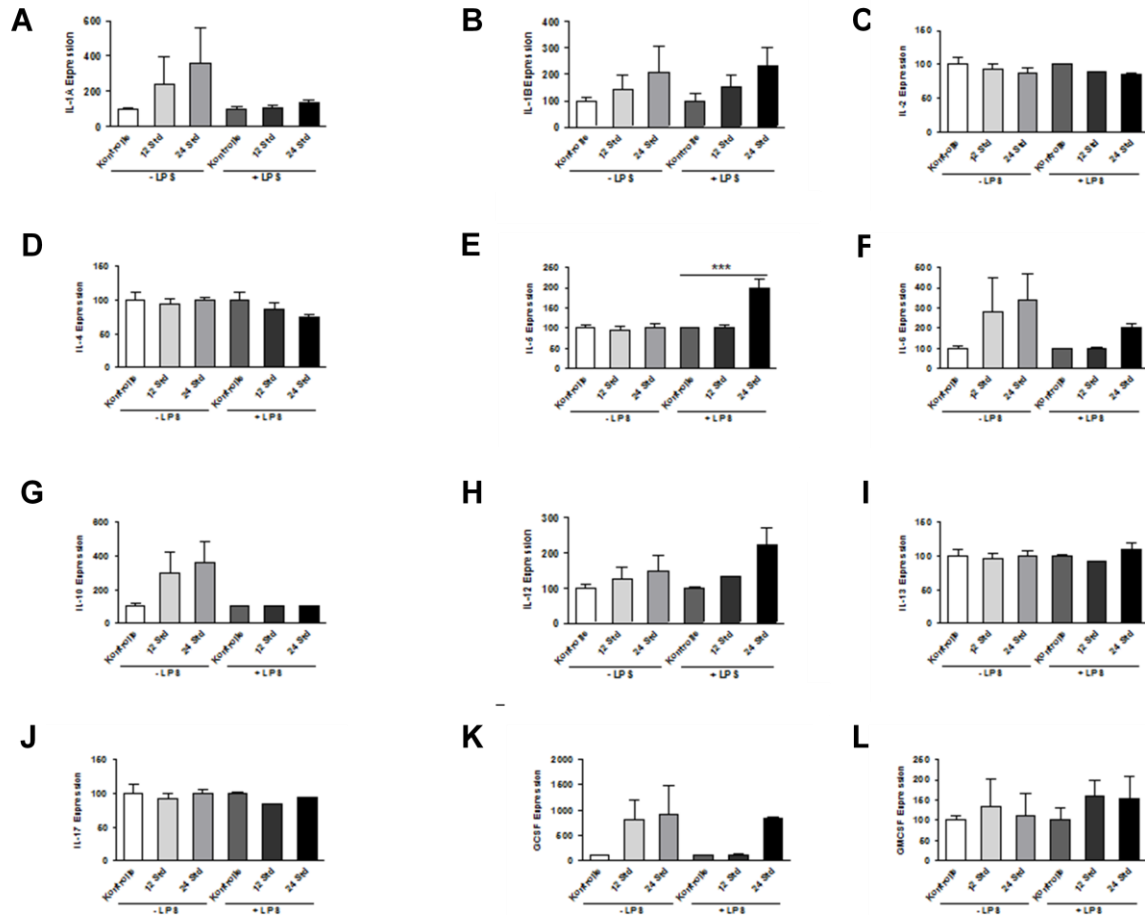


Abbildung 11: Monozyten-LLC1-Zytokinexpressionsmuster.

Abb. 11A-11L: LLC1-Tumorzellen wurden mit murinem Knochenmark entstammenden Monozyten kokultiviert. Die Interaktionszeiten betrugen 12 Stunden und 24 Stunden. Nach Beendigung der Cokultivierungszeiten wurden die konditionierten Medien aufgenommen und der Gehalt von Monozyten und LLC1-Zellen sezernierten Zytokinen in diesen Medien wurde mittels ELISA-Assay untersucht. Als Kontrollgruppen fungierten Monozytenmedien (RPMI, 20 % FCS, 0,1mg/ml P/S, 20ng/ml MCSF, +/- LPS), welche am Tag der Zellausdifferenzierung von diesen abgenommen wurden.

Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4 Der Einfluss von Sorafenib auf das Proliferationsmuster von LLC1-Tumorzellen

In diesen Versuchen wurde der Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf das Proliferationsverhalten von LLC1-Tumorzellen untersucht. Zum einen wurde der direkte Einfluss des Sorafenibs auf die LLC1-Zellen untersucht. Dazu wurde LLC1-Zellen, welche mit LLC1-Zellmedium kultiviert wurden, direkt Sorafenib zugesetzt. Hierbei wurden Sorafenibkonzentrationen von 100nm und 1µm verwendet. Die Kontrollgruppen wurden von LLC1-Zellen repräsentiert, welche für 24 Stunden mit LLC1-Zellmedium inkubiert wurden (RPMI, 10 % FCS, 0,1mg/ml P/S, +/-LPS).

Zum anderen sollte der indirekte Einfluss von Sorafenib, über die Beeinflussung der LLC1-Zellinteraktion mit Makrophagen / Monozyten, auf das Proliferationsverhalten von LLC1-Zellen untersucht werden. Für diesen Versuch wurde miteinander interagierenden LLC1-Tumorzellen und murinen Makrophagen zum einen sowie miteinander interagierenden LLC1-Zellen und murinen Monozyten zum anderen während der Interaktion der Multikinaseinhibitor Sorafenib hinzugefügt. Zum Einsatz kamen hierbei ebenfalls Sorafenibkonzentrationen von 100nm und 1µm. Nach einer Interaktionsdauer von 24 Stunden wurden die Interaktionsmedien aufgenommen und die Zellreihen voneinander separiert und asserviert. Die konditionierten Medien wurden zur Analyse des Proliferationsverhaltens von LLC1-Tumorzellen unter dem Einfluss der durch den Multikinasehemmstoff Sorafenib beeinflussten Medien genutzt.

Als Kontrollgruppen dienten für 24 Stunden inkubierte LLC1-Tumorzellen mit LLC1-Zellmedien (RPMI, 10 % FCS, 0,1mg/ml P/S, +/- LPS).

Es zeigte sich hierbei eine signifikante Reduktion des Tumorzellwachstums jener LLC1-Zellen, welchen Sorafenib in 1µm Konzentration hinzugefügt wurde, unabhängig vom LPS-Status.

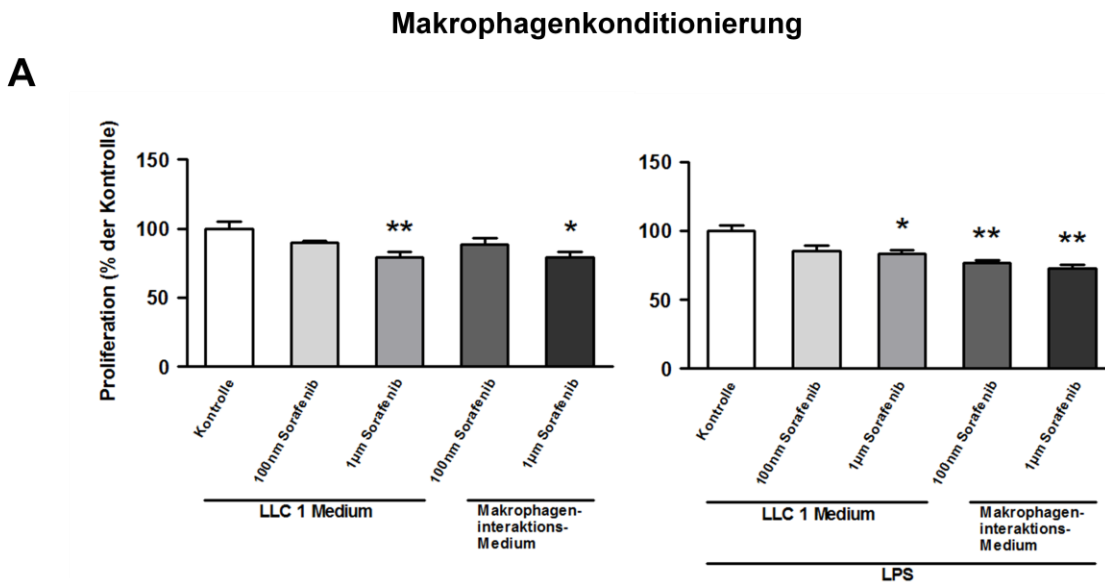
Die Kultivierung von LLC1-Zellen mit makrophagenkonditionierten Medien und Sorafenib führte im Kontrollgruppenvergleich ebenfalls zu einer signifikanten Proliferationsminderung der LLC1-Zellen. Im Falle der LPS-haltigen Gruppe führten die konditionierten Medien zu einer weiteren Wachstumsreduktion der LLC1-Zellen im

Vergleich zu der Kultivierung der Zellen unter LLC1-Zellmedium und Sorafenib, allerdings ohne statistische Signifikanz (Abb. 12A).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Inkubation von LLC1-Tumorzellen mit monozyten- und sorafenibkonditionierten Medien.

In Abbildung 12B zeigt sich, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine deutlich reduzierte Proliferationsrate der LLC1-Zellen unter jenen Medien, welche aus der Interaktion von Monozyten mit LLC1-Zellen unter dem Zusatz von Sorafenib gewonnen worden sind. Dies gilt sowohl für die LPS-freie Gruppe als auch für die LPS-haltige Gruppe und für beide Sorafenibkonzentrationen in den beiden Gruppen. Auch hier zeigt sich wieder ein stärkerer Reduktionstrend des LLC1-Zellwachstums unter den Medien aus der Cokultivierung im Vergleich zu den LLC1-Zellen, welche unter LLC1-Zellmedium und Sorafenibzusatz kultiviert wurden (Abb. 12B).

Proliferationsverhalten von LLC1- Zellen



Proliferationsverhalten von LLC1- Zellen

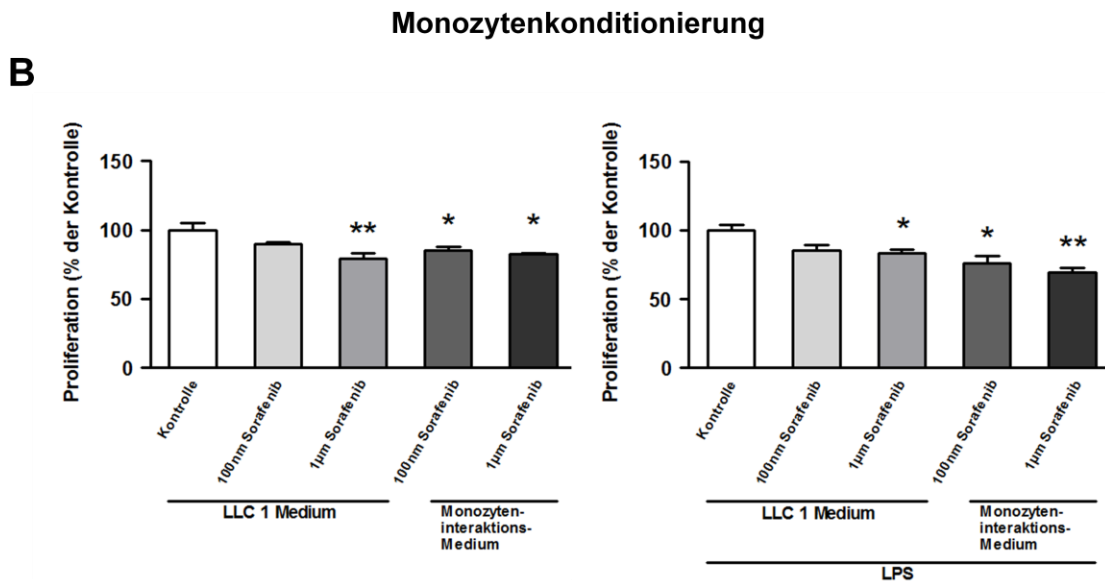


Abbildung 12: Die Auswirkungen von Sorafenib auf das Proliferationsverhalten von LLC1-Zellen.

Abb. 12A-12B: Murinem Knochenmark entstammende Makrophagen und Monozyten wurden unter der Zugabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib in den Konzentrationen von 100nm und 1µm mit Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen für 24 Stunden kokultiviert. Nach Beendigung der Kokultivierungszeit wurden die Medien aufgenommen, um das Proliferationsverhalten von Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen unter diesen Medien mittels BrdU-Proliferations-Assay zu untersuchen. Des Weiteren wurde das Proliferationsverhalten von LLC1-Zellen unter Sorafenib in LLC1-Medium untersucht. Als Kontrollgruppe dienten LLC1-Zellen, welche für 24 Stunden unter RPMI LLC1-Zellmedium (RPMI, 20 % FCS, 0,1mg/ml P/S, +/- LPS) kultiviert wurden.

Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe *p< 0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5.5 Das Zytokinexpressionsmuster von LLC1-Tumorzellen und Monozyten / Makrophagen während gegenseitiger Interaktion unter dem Einfluss von Sorafenib

Zur Analyse des Einflusses des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf das Interaktionsverhalten von LLC1-Zellen mit Makrophagen / Monozyten bezüglich der Zytokinsekretion wurden LLC1-Zellen mit Makrophagen und Monozyten unter dem Zusatz von Sorafenib für 24 Stunden kokultiviert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden sowohl die Zellen als auch die Medien asserviert. Als Kontrollgruppen dienten Medien aus

der Cokultivierung von LLC1-Zellen mit Makrophagen (+/-LPS) ohne den Zusatz von Sorafenib nach einer Interaktionszeit von 24 Stunden.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der quantitativen Zytokinanalysen von makrophagenkonditionierten Medien unter Sorafenibzusatz zu sehen. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung des IL-1A-Gehalts in den Medien, welchen während der Makrophagen und LLC1-Zellinteraktion 100nm Sorafenib zugesetzt wurde, sowie in jenen Medien, welchen neben 100nm Sorafenib zur Interaktion auch LPS zur Makrophagenaktivierung hinzugesetzt wurde. Auch zeigte sich in den Medien aus der Makrophagen-LLC1-Zellinteraktion eine signifikant reduzierte IL-1B-Sekretion. Im Unterschied hierzu zeigte sich in den Medien aus der Cokultivierung LPS-aktivierter Makrophagen mit LLC1-Zellen bei der Zugabe von Sorafenib in 1µm Konzentration ein gesteigerter IL-1B-Gehalt.

Weiterhin zeigte sich der IL-10 Gehalt in den Medien aus der Interaktion LPS aktivierter Makrophagen mit LLC1-Zellen unter Zusatz von 100nm Sorafenib statistisch signifikant reduziert.

Im Gegensatz hierzu wiesen die konditionierten Medien ohne LPS-Zusatz eine Steigerung des IL-4 und GM-CSF-Gehalts unter Sorafenibeeinfluss in den Konzentrationen von sowohl 100nm als auch 1µm auf. Eine Zunahme an IL-13 zeigten die konditionierten Medien mit einem Sorafenibzusatz in der Konzentration von 100nm.

Keine statistisch signifikanten Änderungen der sezernierten Zytokinmengen konnten hingegen für die Zytokine IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, IL-17 und G-CSF festgestellt werden.

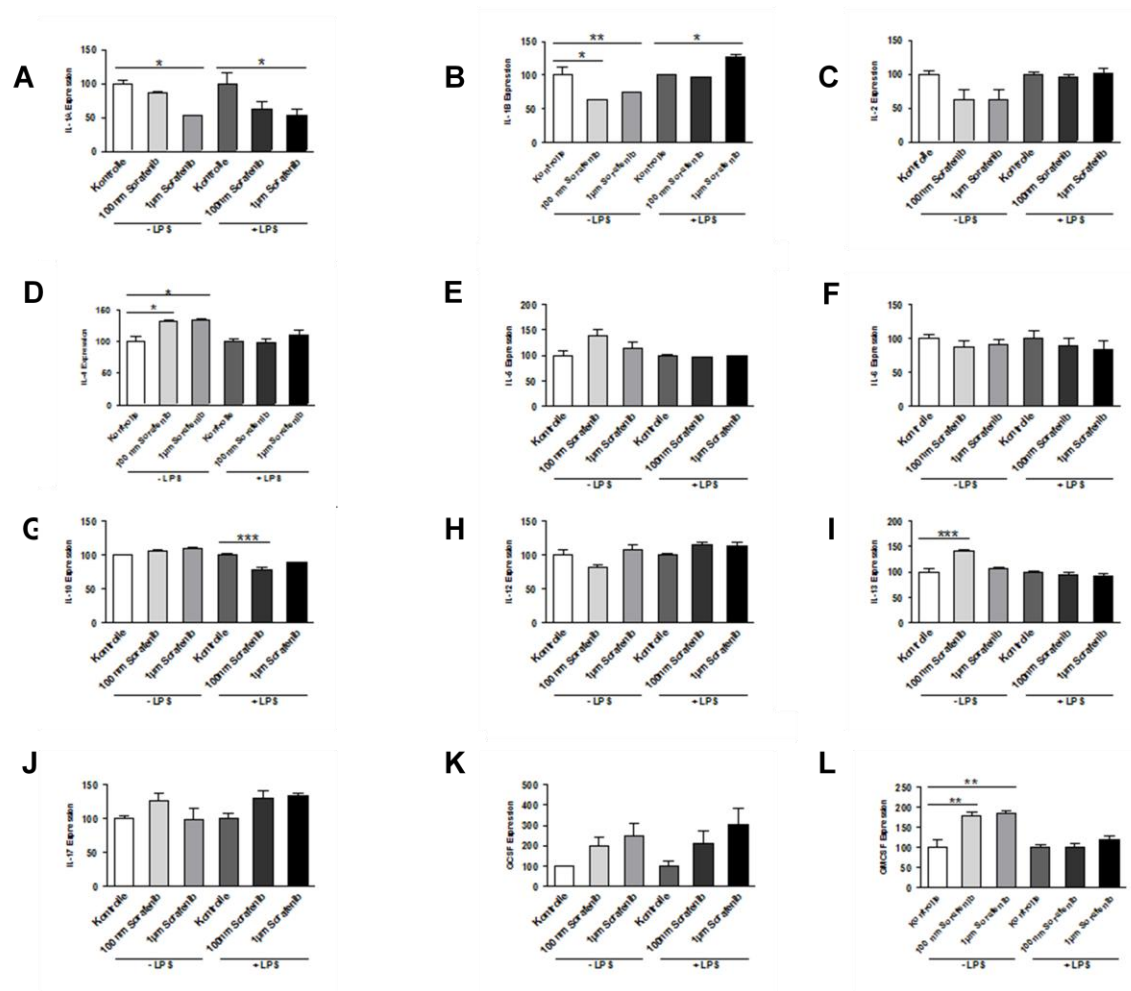


Abbildung 13: Sorafenibeinfluss auf das Makrophagen-LLC1-Zytokinexpressionsmuster.

Abb. 13A-13L: Murinem Knochenmark entstammende Makrophagen wurden unter der Zugabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib in den Konzentrationen von 100 nm und 1 μm mit Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen für 24 Stunden kokultiviert.

Die konditionierten Medien wurden nach Beendigung der Kokultivierungszeit aufgenommen und das Zytokinexpressionsmuster der Makrophagen und LLC1-Zellen wurde in diesen Medien mittels ELISA-Assay untersucht. Die Kontrollgruppe wurde von Interaktionsmedien, welche aus einer 24-stündigen Kokultivierung von LLC1-Zellen und Makrophagen (+/- LPS) ohne den Zusatz von Sorafenib hervorgingen, gebildet.

Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Die Ergebnisse der Zytokinexpressionsmuster der monozytenkonditionierten Medien unter Zusatz des Multikinaseinhibitors Sorafenib zeigt die Abbildung 14. Die unter diesen Bedingungen konditionierten Medien brachten eine Steigerung der IL-2 und IL-12-Sekretion aus der Gruppe der durch 100 nm Sorafenib beeinflussten Monozyten-LLC1-Zell-Interaktion hervor. Des Weiteren zeigte sich eine Zunahme des Gehalts an

IL-13 in den Interaktionsmedien unter Zusatz von sowohl 100nm als auch 1µm Sorafenib. Ebenfalls stiegen unter der Zugabe von 100nm Sorafenib zu den Interaktionsmedien die IL-10-Konzentrationen. In den Interaktionsmedien, die aus LPS stimulierten Monozyten hervorgingen, zeigte sich hingegen lediglich eine Verminderung des IL-1A-Gehaltes. Die Sekretionsraten von IL-1B, IL-4, IL-5, IL-6, IL-17, GCSF und GMCSF veränderten sich in keiner statistisch relevanten Weise. Die Kontrollgruppen stellten Interaktionsmedien von LLC1-Zellen und Monozyten (+/- LPS) nach einer 24-stündigen Inkubation dar, welche ebenfalls auf ihren Zytokingehalt hin untersucht wurden.

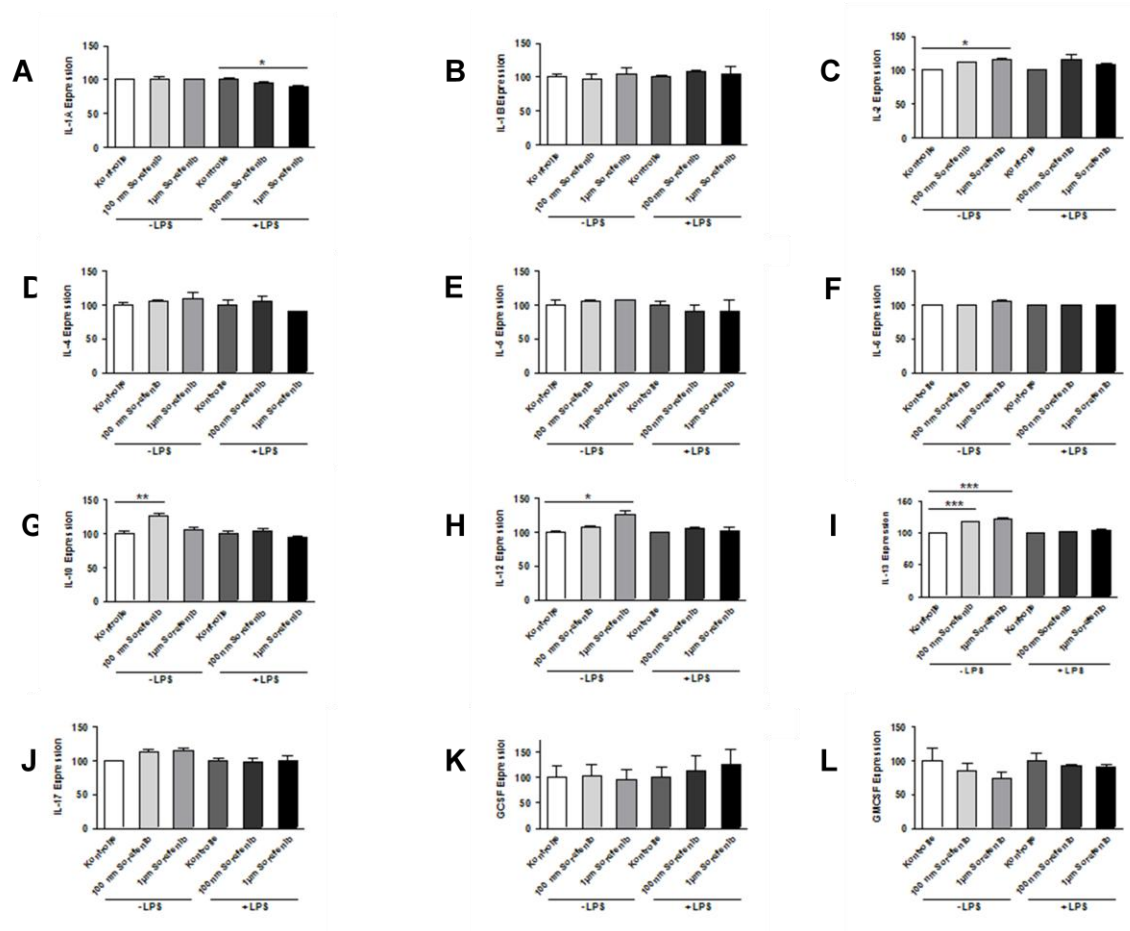


Abbildung 14: Der Effekt von Sorafenib auf das Monozyten-LLC1-Zytokinexpressionsmuster.

Abb. 14A-14L: Unter der Zugabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib wurden murine Monozyten mit Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen für 24 Stunden kokultiviert.

Die konditionierten Medien wurden nach Beendigung der Kokultivierungszeit aufgenommen und die Menge der von den Monozyten und LLC1-Zellen sezernierten Zytokine wurde in diesen Medien untersucht. Zur Anwendung kam ein ELISA-Assay. Die Kontrollgruppe stellten Interaktionsmedien von LLC1-Zellen und Monozyten (+/- LPS) dar, welche 24 Stunden miteinander inkubiert wurden.

Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.6 Das Proliferationsverhalten muriner Makrophagen unter dem Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib

Um die Frage nach dem Einfluss von Sorafenib auf das Wachstumsverhalten von murinen Makrophagen beantworten zu können, wurden diese nach der Generation und Ausdifferenzierung für 24 Stunden unter dem Zusatz des Multikinaseinhibitors Sorafenib inkubiert. Hierbei kamen zwei verschiedene Sorafenib-Konzentrationen von 100nm und 1µm zur Anwendung. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Proliferationsverhalten der Makrophagen unter Einwirkung des Sorafenibs mittels eines BrdU-Assays untersucht. Das Proliferationsverhalten von Makrophagen unter einer 24-stündigen Inkubationszeit mit Makrophagenmedium (RPMI, 20 % FCS, 01mg/ml P/S, 20ng/ml MCSF, +/- LPS) diente als Kontrollgruppe.

Die LPS-aktivierten Makrophagen zeigten, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, unter der Einwirkung des Sorafenibs sowohl unter der 100nm als auch der 1µm-Konzentration ein deutlich reduziertes Zellwachstum.

Interessanterweise zeigten die nicht mit LPS stimulierten Makrophagen ein kaum verändertes Wachstumsverhalten in der Gegenüberstellung mit der Kontrollgruppe (Abb. 15).

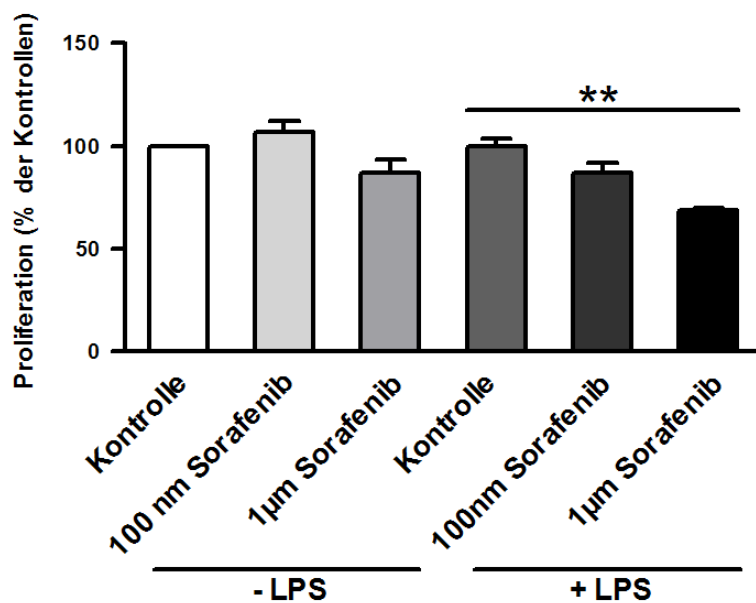


Abbildung 15: Das Proliferationsverhalten von Makrophagen unter der Einwirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib.

Murinem Knochenmark entstammende Makrophagen wurden unter der Zugabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib in den Konzentrationen von 100nm und 1µm für 24 Stunden kultiviert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Proliferationsverhalten der Makrophagen unter diesen Bedingungen mittels BrdU-Proliferations-Assay untersucht.

Als Kontrollgruppen diente das Proliferationsverhalten von Makrophagen unter Makrophagenmedium (RPMI, 20 % FCS, 0,1mg/ml P/S, 20ng/ml MCSF, +/- LPS). Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe *p< 0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5.7 Untersuchung des Wachstumsverhaltens muriner Monozyten unter dem Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib

Aus murinem Knochenmark wurden Monozyten generiert, welche nach ihrer Ausdifferenzierung für eine Dauer von 24 Stunden unter Zugabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib kultiviert wurden. Am Ende der Inkubationszeit wurden die murinen Monozyten hinsichtlich ihres Wachstums mittels eines BrdU-Assays untersucht. Die Kontrollgruppen stellten Monozyten dar, welche unter Monozytenkulturmedien (RPMI, 20 % FCS, 01mg/ml P/S, 20ng/ml GMCSF, +/- LPS) für eine Dauer von 24 Stunden inkubiert wurden.

Erstaunlicherweise zeigten jene Monozytenpopulationen, welchen vor und während der Inkubation 1µm Sorafenib zugesetzt wurde, eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Eine starke Reduktion ihres Wachstums hingegen erfuhren, ähnlich den Makrophagen, die LPS-stimulierten Monozyten sowohl unter einer Sorafenibkonzentration von 100nm als auch von 1µm (Abb. 16).

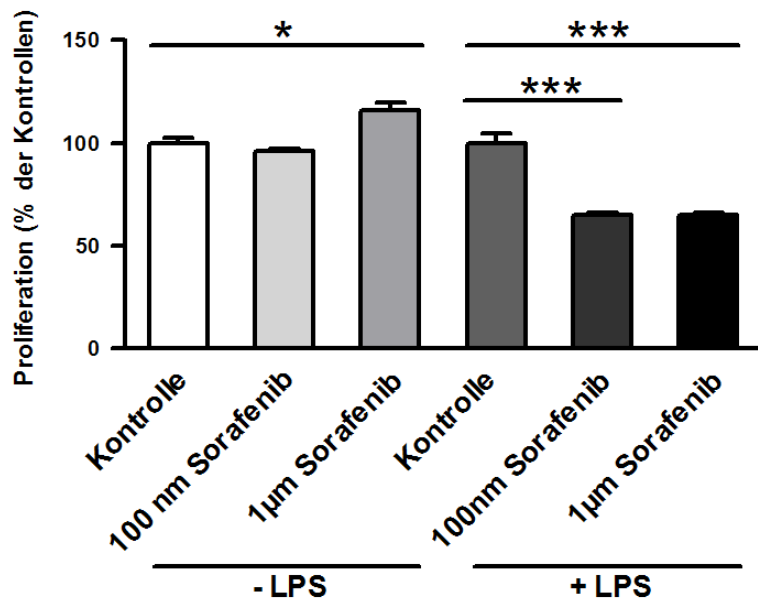


Abbildung 16: Der Effekt von Sorafenib auf das Proliferationsverhalten von Monozyten.

Murine Monozyten wurden unter der Zugabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib für 24 Stunden kultiviert. Zur Anwendungen kamen Sorafenibkonzentrationen von 100nm und 1µm. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Proliferationsverhalten der Monozyten unter diesen Bedingungen mittels BrdU-Proliferations-Assay untersucht. Als Kontrollgruppe diente das Proliferationsverhalten von Makrophagen unter Makrophagenmedium (RPMI, 20 % FCS, 0,1mg/ml P/S, 20ng/ml GMCSF, +/- LPS). Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.8 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 5: Ergebnisse der Cokultivierungs- und Proliferationsversuche

A) Cokultivierungsversuche

Cokultivierungs-Versuche		Gesteigerte Zytokinsekretion	Verminderte Zytokinsekretion
LLC1-Zellen + Makrophagen	ohne LPS	IL-6, GCSF	
	mit LPS	IL-1A, IL-4, IL-10, IL-17	
LLC1-Zellen + Monozyten	ohne LPS		
	mit LPS	IL-5	
LLC1-Zellen + Makrophagen + Sorafenib	ohne LPS	IL-4, IL-13, GMCSF	IL-1A, IL-1B
	mit LPS	IL-1B	IL-1A, IL-10
LLC1-Zellen + Monozyten + Sorafenib	ohne LPS	IL-2, IL-10, IL-12, IL-13	
	mit LPS		IL-1A

B) Proliferationsversuche

Proliferations-Versuche *		Gesteigerte Proliferation	Verminderte Proliferation
LLC1-Zellen mit Interaktionsmedium von LLC1-Zellen + Makrophagen	ohne LPS	+++	
	mit LPS	+++	
LLC1-Zellen mit	ohne	+++	

Interaktionsmedium von LLC1-Zellen + Monozyten	LPS		
	mit LPS	+++	
LLC1-Zellen mit Interaktionsmedium von LLC1-Zellen + Makrophagen + Sorafenib	ohne LPS		100nm: x 1µm: -
	mit LPS		100nm: - - 1µm: - -
LLC1-Zellen mit Interaktionsmedium von LLC1-Zellen + Monozyten + Sorafenib	ohne LPS		100nm: - 1µm: -
	mit LPS		100nm: - 1µm: - -
LLC1-Zellen + Sorafenib	ohne LPS		100nm: x 1µm: - -
	mit LPS		100nm: x 1µm: -
Makrophagen + Sorafenib	ohne LPS		100nm: x 1µm: x
	mit LPS		100nm: x 1µm: - -
Monozyten + Sorafenib	ohne LPS		100nm: x 1µm: -
	mit LPS		100nm: - - - 1µm: - - -

* Anmerkung zu den Proliferationsversuchen: entsprechend des Signifikanzniveaus ist die Anzahl der +/- Zeichen gewählt, ein x steht für keine statistisch signifikante Veränderung.

6 Diskussion

6.1 Problematik

Im Jahre 2008 erkrankten 3,2 Millionen Europäer an einem malignen Tumor und 1,7 Millionen Europäer verstarben infolge einer Neoplasie, worunter 19,9 % bronchialkarzinombedingte Sterbefälle zu verzeichnen sind (Joyce JA et al., 2009).

Tumore bestehen zum einen aus den entarteten Zellverbänden, welche durch das Umgehen regulärer Zellkontrollmechanismen zur eigenständigen Proliferation befähigt sind, sowie zum anderen aus den Zellen des Tumormikroklimas: den Stromazellen und deren sezernierten löslichen Zytokinen (Dirkeze NC et al., 2006; Li H et al., 2007; Zhong L et al., 2008). Zwischen diesen zahlreichen und verschiedenen Zellen findet eine rege, sich während der Tumorprogression stetig verändernde Interaktion statt (Beachmann DA et al., 2005). Durch die Induktion genetischer Alterationen bemächtigen sich Tumorzellen der sie umgebenden Stromazellen, um diese in ihrem Sinne agieren zu lassen (Redente EF et al., 2006). Mittels der Sekretion verschiedener Mediatoren, darunter unter anderem das Monozyten Chemotaktische Protein, rekrutieren Tumorzellen zum Beispiel Monozyten in ihre direkte Umgebung, um dort ihre Ausdifferenzierung zu tumor-assoziierten Makrophagen zu unterstützen. Diese Makrophagen begünstigen ihrerseits wiederum das Tumorstromawachstum auf vielfältige Weise über die Sezernation von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Kimura YN et al., 2007; Kurahara H et al., 2011; Solinas G et al., 2009). Tumorstromazellen stellen in ihrer Summe mehr als 50 % der gesamten Tumormasse dar (Stuelten CH et al., 2010) und sind aufgrund ihrer mannigfaltigen Funktionen elementar an der Tumorprogression beteiligt.

6.2 Darstellung der Studie

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss der Interaktion von murinen LLC1-Tumorzellen mit murinen Monozyten / Makrophagen auf das LLC1-Tumorstromawachstum sowie das Zytokinsekretionsverhalten von LLC1-Tumorzellen und Monozyten/

Makrophagen untersucht werden. Des Weiteren untersuchten wir in dieser Arbeit -im Hinblick auf mögliche Therapieoptionen maligner Erkrankungen und der Erkenntnis, dass

- erstens das Maß der Proliferationsfähigkeit maligner Zellen von Tumorstromazellen beeinflusst ist und
- zweitens für die Ausbildung maligner Transformationen Tyrosinkinasen eine wichtige Rolle spielen (Blume-Jensen P et al., 2001)-

den Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf das Proliferationsverhalten von LLC1-Tumorzellen sowie Monozyten / Makrophagen sowie auf das Proliferations-/Zytokinexpressionsmuster von LLC1-Zellen und Monozyten / Makrophagen unter gegenseitiger Interaktion. Grundlage aller Untersuchungen waren Cokultivierungsversuche mit murinen Zellen.

Wir generierten aus murinem Knochenmark sowohl Monozyten (Chu XY et al., 2005) als auch Makrophagen (Lin H et al., 2001; Sinha S et al., 2008; Minami M et al., 2008) und inkubierten die ausdifferenzierten Zellen getrennt voneinander auf 24-well-Platten zusammen mit auf Membranfiltern adhärenzierten LLC1-Zellen für 12 und 24 Stunden. Während der Interaktion fand kein direkter Zellkontakt zwischen den Monozyten / Makrophagen und LLC1-Zellen statt (Cakarova L et al., 2009). Vor und während der Versuche wurde eine Hälfte der Monozyten / Makrophagenpopulationen mittels LPS in einen aktivierten Zustand versetzt (Sinha S et al., 2008).

In einer weiteren Versuchsreihe fügten wir miteinander interagierenden Monozyten/Makrophagen und LLC1-Tumorzellen den Multikinaseinhibitor Sorafenib hinzu. Wir applizierten Sorafenib in zwei verschiedenen Konzentrationen von 100nm und 1µm in die Interaktionsmedien.

Die aus den Cokultivierungsversuchen gewonnenen Medien wurden für Proliferationsversuche sowie Zytokinexpressionsuntersuchungen verwendet.

6.2.1 Gesteigerte LLC1-Tumorzellproliferation unter konditionierten Medien

Unsere Ergebnisse zeigen einen signifikanten Anstieg der Proliferation von LLC1-Tumorzellen sowohl unter makrophagen- als auch monozytenkonditionierten Medien im Vergleich zu den Kontrollgruppen, in welchen das Wachstum von LLC1-Tumorzellen

unter unkonditionierten Medien gemessen wurde. Ebenfalls zeigte sich ein signifikant gesteigertes Wachstum der LLC1-Zellen unter der Inkubation mit konditionierten Medien aus der Interaktion von LLC1-Zellen und LPS-aktivierter Makrophagen zum einen und LPS-aktivierter Monozyten zum anderen.

Diese Ergebnisse bringen die große Bedeutung der Tumorstromazellen am Beispiel von Monozyten und Makrophagen für das Proliferationsverhalten von malignen Zellen am Beispiel von LLC1-Tumorzellen zum Ausdruck. In Anwesenheit von Monozyten und Makrophagen und durch die Möglichkeit der gegenseitigen Interaktion zeigen die Tumorzellen ein gesteigertes Zellwachstum im Vergleich zu ihrem Wachstum ohne die Anwesenheit der Interaktionsprodukte aus der Cokultivierung mit Monozyten/Makrophagen. Diese Funktionsumkehr von Zellen des Immunsystems, maligne Zellen in ihrem Wachstum zu unterstützen, anstatt diese zu eliminieren, ist das Ergebnis sehr ausdifferenzierter Fähigkeiten der Tumorzellen, unreife Zellen zu ihren Gunsten zu manipulieren und die Aktivitäten des Immunsystems einzudämmen (Solinas G et al., 2009; Pollard JW, 2009).

6.2.2 Das Proliferationsverhalten von LLC1-Zellen unter Sorafenib

6.2.2.1 Das Wachstum von LLC1-Zellen unter der Zugabe von Sorafenib

Eine 24-stündige Inkubation von LLC1-Tumorzellen zusammen mit Sorafenib hatte einen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen. Unter der Einwirkung von Sorafenib kam es zu einer Reduktion des Tumorzellwachstums im Vergleich zu den Kontrollgruppen, welche von LLC1-Zellen unter der Kultivierung von LLC1-Medium (+/- LPS) repräsentiert wurden.

Ebenfalls führte die Kultivierung von LLC1-Zellen unter makrophagen-/monozytenkonditionierten und sorafenibhaltigen Medien zu einer Reduktion der LLC1-Zellproliferation. Durch die Kultivierung der LLC1-Zellen mit makrophagen-/monozytenkonditionierten Medien und Sorafenib konnte in den LPS-haltigen Gruppen sogar eine stärkere Wachstumshemmung gegenüber der Proliferation der LLC1-Zellen

unter LLC1-Medium und Sorafenib beobachtet werden. Diese weitere Proliferationsminderung war allerdings ohne statistische Signifikanz.

Sorafenib ist ein Multikinaseinhibitor, der die Autophosphorylierung diverser Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (darunter: VEGFR1, 2 and 3, PDGFR β , c-Kit and RET) sowie der nachgeschalteten Raf-Kinase-Isoformen verhindert (Wilhelm S et al., 2006) und die Aktivität der BCR/ABL-Kinase (Kurosu T et al., 2009) sowie von STAT 3 (Signal Transducer and Aktivator of Transcription) (Tai WT et al., 2011) inhibiert. In Folge führt Sorafenib zu einer Inhibition des Wachstums von Tumorzellen sowie zur Induktion der Apoptose in Tumorzellen (Hipp MM et al., 2008; Porta C et al., 2011; Mangiameli DP et al., 2007). In diversen Studien hat Sorafenib sein Potenzial bewiesen, das Wachstum maligner Tumore in Xenograft-Modellen des Papillären Schilddrüsenkarzinoms, des Hepatozellulären Karzinoms und des Malignen Melanoms zu inhibieren (Henderson YC et al., 2008; Liu L et al., 2006; Trivedi N et al., 2004) sowie das Wachstum des NSCL in Xenograft Modellen beeinflussen zu können (Wilhelm S et al., 2004).

Unsere Ergebnisse zeigen diese Wachstumsreduktion maligner Zellen unter der Wirkung von Sorafenib in der Kultivierung der LLC1-Zellen mit LLC1-Kulturmedium und Sorafenibzusatz sowie auch unter Medien aus der Interaktion von LLC1-Zellen mit Makrophagen / Monozyten.

6.2.3 Die Auswirkungen von Sorafenib auf das Wachstum von Makrophagen und Monozyten

Die Applikation von Sorafenib zu Monozyten- sowie zu Makrophagenpopulationen brachte in unseren Versuchen ebenfalls ein deutlich reduziertes Zellwachstum sowohl in den Monozytenpopulationen als auch in den Makrophagenpopulationen hervor. Eine signifikante Reduktion der Zellproliferation zeigten mit LPS aktivierte Monozyten und Makrophagen unter dem Einfluss von Sorafenib im Kontrollgruppenvergleich.

Unserer Meinung nach zeigen diese Ergebnisse, dass Sorafenib zum einen eine direkte Wirkung auf Tumorzellen ausübt und zum anderen auch fähig ist, direkt auf Tumorstromazellen Einfluss zu nehmen, vermutlich über jene Mechanismen, mit Hilfe

derer es an den malignen Zellen angreift. Hipp et al. konnten 2008 zeigen, dass Sorafenib auch eine andere Stromazellart beeinflusst. Sie wiesen die Fähigkeit von Sorafenib nach, in dendritischen Zellen Apoptose induzieren zu können (Hipp MM et al., 2008).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die Behandlung von LLC1-Zellen, Makrophagen und Monozyten getrennt voneinander mit Sorafenib in allen drei Gruppen zu einer deutlichen Proliferationsminderung führt. Einen weiteren Wachstumsreduktionstrend der LLC1-Zellen konnten wir durch die Kultivierung der LLC1-Zellen mit makrophagen- und monozytenkonditionierten Medien (denen während der Interaktion mit den LLC1-Zellen Sorafenib und zur Aktivierung LPS zugesetzt worden war) erreichen. Die in Ansätzen verstärkte Wirkung von Sorafenib auf das Wachstum der LLC1-Zellen unter den cokultivierten Medien liegt aus unserer Sicht in einem inhibitorischen Einfluss, den das Sorafenib auf den Interaktionsvorgang von Tumor- und Immunzellen sowie den dabei ablaufenden Prozessen ausübt.

6.2.4 Der Effekt der Cokultivierung auf das Zytokinexpressionsmuster von LLC1-Zellen und Monozyten / Makrophagen

Die Analyse der konditionierten Medien aus den Cokultivierungsversuchen von LLC1-Zellen und Makrophagen zeigte eine deutliche Zunahme der IL-6 und GCSF-Produktion. Des Weiteren wiesen die konditionierten Medien LPS-aktivierter Makrophagen eine stark gesteigerte Sekretion von IL-1A, IL-4, IL-10 und IL-17 auf. Die Menge des sezernierten IL-6 zeigte ebenfalls eine deutliche Zunahme in den Cokultivierungsmedien, allerdings ohne statistische Signifikanz aufzuweisen.

In den monozytenkonditionierten, LPS-haltigen Medien zeigte sich eine signifikante Steigerung des IL-5. Weiterhin fand sich sowohl in den LPS-haltigen wie auch in den LPS-freien Cokultivierungsmedien für folgende Interleukine ein Sekretionssteigerungstrend: IL-1A, IL-1B und IL-6 ebenso wie die LPS-freien Interaktionsmedien für IL-10 und GCSF.

Ein Tumor und sein Mikromilieu sind ein heterogenes Gemisch aus sowohl malignen als auch nicht malignen Zellen, löslichen Faktoren sowie strukturellen Komponenten (Zhong L et al., 2008). Einen der Hauptakteure in der zellulären Riege stellen die Makrophagen und

Monozyten dar. In der Interaktion mit malignen Zellen sezernieren sie eine Reihe, das Tumorzellwachstum sowie die Fähigkeit zur Metastasierung unterstützender proinflammatorischer Zytokine (Pollard JW, 2004; Solinas G et al., 2009). Diese Funktionsumkehr erfahren sie aufgrund der Manipulationsfähigkeit maligner Zellen, ungeprägte Zellen in ihrem Sinne steuern zu können, um dadurch immunsuppressiv zu wirken (Balkwill F, 2004; Malkinson AM, 2005; Pollard JW, 2004).

Um ihre metabolischen und nutritiven Bedürfnisse für ein optimales Wachstum zu stillen, benötigen Tumorzellen ein ausreichendes Gefäßnetz. Von Tumorzellen manipulierte Makrophagen und Monozyten, welche aufgrund ihrer Fähigkeit zur Migration optimale Verbündete des Tumors darstellen, helfen den Tumorzellen diese Belange zu decken, indem sie unter anderem verschiedene proangiogene Substanzen, wie VEGF, Matrixmetallproteinase und IL-1 sezernieren.

IL-1, zu dessen wichtigsten Produzenten Monozyten und Makrophagen gehören (Scatizzi J-C et al., 2009), induziert über eine Reaktionskaskade die Produktion von VEGF, einem der Hauptstimuli der Angiogenese, sowie von IL-8 (Pollard JW, 2004; Torisu H et al., 2000). VEGF und IL-8 vermögen ihrerseits, die Migration von vaskulären Endothelzellen anzustoßen (Kimura YN et al., 2007) und die Entstehung neuer Gefäße zur Versorgung des wachsenden Tumors zu unterstützen. Des Weiteren werden Fibroblasten durch das von Monozyten und Makrophagen sezernierte IL-1 zur Produktion von Prostaglandin PGE₂ und Matrix Metallproteinase stimuliert. Prostaglandin PGE₂ und Matrix Metallproteinase führen zur Dekomposition und Destruktion der extrazellulären Matrix (Bormann K-H et al., 2010), wodurch ebenfalls die Schaffung eines für Tumore optimalen Milieus gefördert wird.

Weiterhin unterstützt IL-1 die Fähigkeit, vor allem in Zusammenspiel mit IL-6 und TNF- α , die Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen zu steigern (Mantovani A et al., 2008). Giavazzi et al. konnten in einem Mausversuch zeigen, dass eine Anreicherung von IL-1 zu einer vermehrten Metastasierung humaner Melanomzellen führt (Giavazzi R et al., 1990).

Die erhöhten IL-1 Konzentrationen in den Cokultivierungsmedien sind unserer Ansicht nach Ausdruck der wichtigen Funktionen, die IL-1 in der Tumorbologie und der Interaktion von malignen Zellen mit Stromazellen spielt.

Bei der Berücksichtigung der Funktionen von IL-6 erscheinen die erhöhten Spiegel in den Kokultivierungsmedien ebenfalls schlüssig. Schon lange ist IL-6 dafür bekannt, in malignen Erkrankungen eine Rolle in der Tumorentstehung sowie auch Progression zu spielen (Porta C et al., 2009; Colotta F et al., 2009). Für das Karposisarkom (Osborne J et al., 1999) und das Multiple Myelom (Bommert K et al., 2006; Colotta F et al., 2009) ist die tragende Rolle des IL-6 in vielen Studien schon beschrieben worden. Im Falle des Multiplen Myelom wird das IL-6 vornehmlich von Stromazellen produziert und eine Interaktion mit den malignen Plasmazellen vermag dabei die synthetisierte IL-6-Menge noch zu erhöhen (Chauhan D et al., 1996). Neben einer wachstumsunterstützenden und antiapoptotischen Funktion (Naugler WE et al., 2008) scheint IL-6 weiterhin die Fähigkeit zu besitzen, Proteine der extrazellulären Matrix degenerieren zu können, wodurch malignen Zellen die Migration und Invasion in benachbartes Gewebe erleichtert wird. Dazu kann es neben weiteren wichtigen Faktoren zur Degeneration von Proteinen der extrazellulären Matrix wie TGF- β , PDGF und Matrixmetallproteinasen von Makrophagen sezerniert werden (Allavena P et al., 2008).

Auch die erhöhten Konzentrationen von IL-17 in den Interaktionsmedien erscheinen plausibel. IL-17 gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen (Chang SH et al., 2010) und wird unter anderem von Monozyten und Makrophagen produziert (Liu J et al., 2011). In verschiedenen experimentellen Studien konnte bislang eine positive Korrelation von IL-17 und verschiedenen Neoplasien gezeigt werden (Lin W-W et al., 2007). Non-Small-Lung-Cancer-Zellen, Zervical-Karzinom-Zellen und Fibrosarkom-Zellen zeigten allesamt ein größeres Wachstumspotenzial bei Überexpression von IL-17 im Vergleich zu den Kontrollgruppen, in denen IL-17 nicht überexprimiert worden war (Tartour E et al., 1999; Numasaki M et al., 2005; Numasaki M et al., 2003). Tartour et al. und Numasaki et al. schrieben diese tumorwachstumunterstützende Funktion den proangiogenen Fähigkeiten des IL-17 zu. Liu et al. fanden eine positive Korrelation von IL-17, welches aus vornehmlich Makrophagen / Monozyten und TH17-Zellen stammt und der Mikrogefäßdichte in Kolorektalen Karzinomen sowie eine IL-17 induzierte VEGF-Produktion (Liu J et al., 2011). Des Weiteren zeigten sich in dem IL-17 getriggerten Zervix-Karzinomwachstum eine vermehrte Ansammlung von Makrophagen sowie eine

erhöhte IL-6 Expression (Tartour et al., 1999), was die Vermutung nahe legt, IL-17 verstärke seine Wirkung mit Hilfe von IL-6 (Lin W-W et al., 2007).

Die Effekte von IL-10 in der Tumorbilogie, welche als antiinflammatorisch und immunsuppressiv bekannt sind (Pestka S et al., 2004), scheinen in erhöhtem Maße komplex zu sein. So kommen bisherige Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen ob der Funktion von IL-10 in der Tumorentwicklung (Lin W-W et al., 2007). Auf der einen Seite besitzt IL-10 die Fähigkeit, gegen maligne Zellen zu arbeiten. So vermag IL-10, die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 und TNF- α in Makrophagen zu inhibieren (Huang S et al., 1999). Weiterhin zeigt IL-10 während der Tumorgenese sowohl antiapoptotische als auch antiangiogene Wirkung (Kundu N et al., 1997; Blankenstein T, 2005), wobei die antiangiogene Wirkung durch die Inhibition des Tumorstromas denkbar erscheint (Blankenstein T, 2005). Tumorzellen selbst sezernieren unter anderem IL-10 und IL-4, um zum einen die zytotoxischen Fähigkeiten von Makrophagen und zum anderen die MHC Klasse II assoziierte Antigenpräsentationsfähigkeit der Makrophagen für T-Zellen zu inhibieren (Elgert KD et al., 1998). Auf der anderen Seite mehren sich die Hinweise, dass IL-10 auch den Tumor unterstützende Funktionen inne hat (Lin W-W et al., 2007). So soll in Burkitt-Lymphomen durch Tumorzellen und Makrophagen produziertes IL-10 die Produktion von Mitgliedern der TNF-Familie erhöhen, welche das Weiterleben der malignen Zellen unterstützen (Ogden CA et al., 2005). Weiterhin schwächt IL-10 die gegen maligne Zellen gerichtete Aktivität von Zytotoxischen T-Zellen ab (Coussens LM et al., 2002) und die Fähigkeit des IL-10, die Immunantwort des adaptiven Immunsystems zu unterdrücken, mag Teil der Tumor Escapemechanismen sein (Mocellin S et al., 2005). Klinisch haben Patienten mit einem Hodgkin Lymphom eine schlechte Prognose bei hohen IL-10 Spiegeln (Rautert R et al., 2008).

Welche Wirkung das IL-10 bei diesem großen und sehr gegensätzlichen Wirkungsspektrum im Einzelnen entfaltet, mag von den Interaktionen mit den anderen Cytokinen des Tumormikroklimas abhängig sein (Lin W-W et al., 2007). Ein ähnlich weites und gegensätzliches Wirkspektrum wird in verschiedenen Studien für IL-4 beschrieben. So finden sich Studien, in denen IL-4 inhibitorisch auf das Wachstum maligner Zellen wirkt (Kawakami K et al., 2000; Gooch JL et al., 2002), wie auch Studien, in denen positive

Effekte auf die Proliferation von Tumorzellen beschrieben sind (Prokopchuk O et al., 2005).

Einen Hinweis über eine mögliche Funktion der erhöhten IL-4 und IL-10 Spiegel in den Cokultivierungsmedien bieten Lewis CE et al. an. Von Lewis CE et al. wurde 2006 diskutiert, dass eine Polarisation von Makrophagen zu einem M2 Phänotypen mit tumorunterstützenden Funktionen nicht nur durch den Kontakt mit IL-4 und IL-13, Toll-Like-Rezeptor-Liganden oder IL-10 und Glukokortikoiden (Pollard JW, 2004; Mantovani A et al., 2002), sondern auch durch die Exposition mit IL-4 und IL-10 möglich sei (Lewis CE et al., 2006). Von Tumorzellen sezerniertes IL-4 und IL-10 besitzt weiterhin die Fähigkeit, die zytotoxische Aktivität von aktivierten Makrophagen zu vermindern (Elgert KD et al., 1998). In diesem Licht erscheinen unsere Ergebnisse von erhöhten IL-4- und IL-10-Konzentrationen in den Interaktionsmedien plausibel.

6.2.5 Das Zytokinexpressionsmuster von LLC1-Tumorzellen und murinen Monozyten / Makrophagen in Cokultivierung unter Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib

Es zeigte sich bei der Untersuchung der Cokultivierungsmedien mit Sorafenibzusatz von LLC1-Zellen und Makrophagen eine verminderte Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1A sowie IL-1B, eine Zunahme des Gehalts an IL-10 sowie eine vermehrte Sekretionsmenge der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13. Im Gegensatz hierzu fanden wir in monozytenkonditionierten Medien eine signifikante Abnahme des Gehalts an IL-1A bei einer gesteigerten Sezernation von IL-10, IL-12 und IL-13.

Hipp et al. untersuchten 2008 anhand von dendritischen Zellen und T-Zellen, welchen Einfluss Sorafenib auf Zellen des Tumorstromas ausübt. Dabei konnten verschiedenartige Auswirkungen von Sorafenib auf die Immunzellen gezeigt werden. Sorafenib hemmte bei den dendritischen Zellen die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-12, TNF- α), die Fähigkeit zur Migration sowie zur Stimulation von T-Zellen. Des Weiteren führte Sorafenib bei den dendritischen Zellen zu einer verminderten Aktivierbarkeit und zu phänotypischen Veränderungen mit verminderter Expression von Oberflächenmolekülen

(Moleküle des MHC-Komplexes, der Adhäsion und Costimulation). Im Gegensatz hierzu hatte Sorafenib keinen Effekt auf den Phänotypen und die Funktion der T-Zellen (Hipp MM et al., 2008). Einen inhibitorischen Effekt von Sorafenib auf die Zytokinsekretion von nicht malignen Zellen konnten Krusch et al. 2009 nachweisen. Sie zeigten eine verminderte Zytokinsekretionsrate von peripheren Blutzellen des mononukleären Systems unter der Wirkung von Sorafenib. Des Weiteren fanden sie eine verminderte Reaktivität von Natürlichen Killerzellen gegenüber Tumorzellen unter Sorafenibzusatz (Krusch M et al., 2009). Unsere Ergebnisse bestätigen die Fähigkeit von Sorafenib, das Zytokinsekretionsmuster seiner Zielzellen beeinflussen zu können. Das Zytokinexpressionsmuster der miteinander interagierenden LLC1-Zellen und Makrophagen / Monozyten verändert sich in unseren Versuchen unter Sorafenibeinwirkung. Es zeigt sich eine Reduktion der Konzentration des proinflammatorischen IL-1 sowie eine Steigerung der Sekretion der klassischen antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13, erhöhte Konzentrationen von GMCSF und IL-12 sowie ein unterschiedliches Verhalten von IL-10 in den makrophagen-/monozytenkonditionierten Medien.

In den Interaktionsmedien zeigten sich erhöhte Konzentrationen von IL-12 und GMCSF, zwei Zytokine, welche beide von phagozytierenden Zellen (IL-12, GMCSF) und malignen Zellen (GMCSF) produziert werden können (Colombo MP, 2002; Dranoff G, 2004; Jinushi M et al., 2009) und welchen in diversen Studien multiple tumorinhibitorische Effekte nachgewiesen wurden. Die Kombination beider Zytokine führte dabei sogar zu synergistischen Effekten (Hill HC et al., 2002; Nair RE et al., 2006). GMCSF aber auch IL-12 werden vor allem wegen ihrer Fähigkeit potente Induktoren einer ordentlichen Antigenpräsentation mit folgender koordinierter humoraler sowie zellulärer Immunantwort zu sein, anti-tumorale Effekte zugeschrieben (Dranoff G, 2002; Bubenik J, 2011). Zu den Zielzellen von IL-12 gehören zum einen T-Zellen, aber auch mononukleäre Zellen wie Makrophagen sowie dendritische Zellen, über welche IL-12 seine inhibitorischen Funktionen in der Tumorgenese wahrnimmt (Colombo MP, 2002).

Weiterhin fanden wir in den Interaktionsmedien erhöhte Spiegel von IL-4 und IL-13, die in der Literatur als typischerweise von T-Zellen sezerniert beschrieben werden und bei

gemeinsamer Nutzung von Rezeptorkomponenten mit ähnlichen Funktionen in Verbindung gebracht werden (Prokopchuk O et al., 2005; Kanai T et al., 2000; Gordon S, 2003; Terabe M et al., 2004). Bezüglich des Wirkungsspektrums werden sowohl IL-4 als auch IL-13 in verschiedenen Studien gänzlich unterschiedliche Funktionen zugesprochen. Ähnlich dem IL-10 werden auch IL-4 und IL-13 in einem Teil der Studien tumorhemmende Wirkungen zugesprochen, während in anderen Studien Hinweise für Tumorwachstum und -entwicklung förderliche Einflüsse für IL-4 und IL-13 gefunden werden.

Erhöhte IL-4/IL-13 Spiegel sind für eine Vielzahl an humanen Tumorzellen beschrieben, darunter für IL-4: maligne neoplastische Zellen der Lunge, der Mamma und des Colons (Todaro M et al., 2008) und für IL-13: in Tumoren des Ovars, der Mamma und des Pankreas (Ripley D et al., 2004; Aspod C et al., 2007; Formentini A et al., 2009). Kawakami et al. sowie Gooch et al. fanden in ihren Studien wachstumsinhibitorische Wirkungen von IL-4 auf Tumorzellen (Kawakami K et al., 2000; Gooch JL et al., 2002) sowie die Fähigkeit, in diesen Apoptose zu induzieren (Gooch JL et al., 1998). Ähnliche Beobachtungen konnten für IL-13 gemacht werden. Verschiedene Studien zeigten für dieses Zytokin ebenfalls einen hemmenden Effekt auf das Wachstum unterschiedlicher Tumorzelllinien (Serve H et al., 1996; Obiri NI et al., 1996; Renard N et al., 1994). Im Gegensatz hierzu konnten Prokopchuk et al. zeigen, dass IL-4 das Wachstum maligner Pankreastumorzellen fördert und von den Tumorzellen selber produziert wird (Prokopchuk O et al., 2005). Gocheva et al. konnten 2010 ebenfalls eine endogene Produktion von IL-4 bei malignen Zellen nachweisen. Weiterhin konnten sie zeigen, dass IL-4 fähig ist, in tumorassoziierten Makrophagen die Produktion von Cathepsinen zu induzieren und somit die Tumorerinvasion zu unterstützen (Gocheva V et al., 2010). Formentini et al. und Fujisawa et al. konnten für Pankreas-Tumorzellen eine autocrine Produktion von IL-17 verbunden mit einem positiven Einfluss auf das Wachstum der malignen Zellen nachweisen (Fujisawa T et al., 2009; Formentini A et al., 2009), ebenso wie Skinnider BF et al. dieses für Hodgkin-Tumorzellen zeigen konnten (Skinnider BF et al., 2001; Skinnider BF et al., 2002).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte des IL-4 auf verschiedene Zellen bieten Chang et al. an. Sie konnten zeigen, dass IL-4 drei verschiedene Signaltransduktionswege an seinem Rezeptor auslösen kann und schlagen vor, dass seine

spezifische Wirkung abhängig von dem ausgelösten Pfad sein könnte. Demnach würde eine Aktivierung von Stat 3 zu einer vermehrten Zellproliferation führen, wohingegen eine Aktivierung von Stat1 durch IL-4 zu einer Wachstumsinhibition führen würde (Chang TL et al., 2000). In unseren Versuchen haben wir den miteinander interagierenden Makrophagen / Monozyten und LLC1-Tumorzellen Sorafenib zugesetzt, welches ein potenter Stat 3-Inhibitor ist. Daher schreiben wir den erhöhten IL-4 Spiegeln in diesem Zusammenhang wachstumsinhibitorische Funktionen zu.

Durch den Kontakt mit IL-4 und IL-13 entwickeln Makrophagen einen M2 Phänotypen, welche auch tumorassoziierte Makrophagen aufweisen (Pollard JW, 2004; Mantovani A et al., 2002). Die Kombination von erhöhten IL-4 Spiegeln und IL-13 Konzentrationen in den konditionierten Medien mögen ein Hinweis sein, dass während der Interaktion von Tumorzellen und Makrophagen unter der Einwirkung von Sorafenib eine solche Polarisation stattgefunden haben könnte. Diese Rekrutierung von "Verbündeten" könnte als eine Art Abwehrreaktion der malignen Zellen auf die gegen sie gerichtete Sorafenibtherapie gesehen werden. Eine Verbindung zwischen erhöhten IL-13 Spiegeln und M2 Makrophagen mit unterstützenden Funktionen für die malignen Zellen stellen auch Aspod C et al. her (Aspod C et al., 2007). Im Gegensatz hierzu diskutieren Ma H-L et al. hingegen einen tumorinhibitorischen Effekt im Hinblick auf die Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten durch IL-13 (Ma H-L et al., 2004).

Hinsichtlich des Zytokinexpressionsmusters bleibt festzuhalten, dass den Erwartungen gemäß in den Interaktionsmedien die Konzentration der klassischen antiinflammatorischen Zytokine IL-4 (Prokopchuk O et al., 2005) und IL-13 (Smigielska-Kuzia J et al., 2010), welche kontextabhängig inhibitorisch aber auch supportiv auf das Wachstum maligner Zellen wirken können, drastisch erhöht war. Unter den von uns induzierten Umständen schreiben wir in Anbetracht der Wirkmöglichkeiten des Sorafenibs dem IL-4 anti-tumoröse Funktionen zu. Ebenfalls zeigten sich erhöhte IL-12 und GM-CSF-Spiegel in den Cokultivierungsmedien, welche ebenfalls inhibitorisch auf das Wachstum maligner Zellen wirken. Eine Reduktion des proinflammatorischen IL-1 genügt ebenfalls unseren Erwartungen. Die unter Sorafenibeeinfluss in den Interaktionsmedien unveränderten IL-6

Spiegel mögen technisch bedingt sein bei Konzentrationen von IL-6, welche für sämtliche Interaktionsmedien die oberen Grenzwerte der ELISA-Arrays passierten.

Ein unterschiedliches Sekretionsverhalten fand sich in den Cokultivierungsmedien für IL-10, welchem, ähnlich IL-4 und IL-13, unterschiedliche Effekte bezüglich der Tumorgenese zugesprochen werden. Die erhöhten Spiegel mögen, neben IL-4 und IL-13 (Pollard JW, 2004; Mantovani A et al., 2002), ebenfalls zusammen mit IL-4 (Lewis CE et al., 2006) ein Hinweis auf eine tumorinduzierte M2 Polarisation von Makrophagen sein, möglicherweise als Reaktion auf die Sorafenibwirkung.

6.3 Fazit

Maligne Tumore bestehen zum einem Teil aus den entarteten Zellen, welche sich nicht mehr den regulären Mechanismen der Zellzykluskontrolle unterwerfen.

Den anderen Anteil an einem Tumor bilden Tumorstromazellen und deren lösliche Produkte. Dies sind, isoliert betrachtet, benigne Zellen verschiedener Herkunft, zu denen unter anderem Monozyten und Makrophagen gehören (Direkze N et al., 2006; Li H et al., 2007; Zhong L et al., 2008). Im Verlauf der Interaktion mit den malignen Zellen unterziehen sich die Stromazellen einer Transformation, durch welche diese einen Funktionswechsel erfahren und ihre Arbeit in den Dienst der malignen Zellen stellen. Die gegenseitige Wechselbeziehung führt zu veränderten Signaltransduktionen mit Immunsuppression, Umstrukturierung der Extrazellulären Matrix sowie Reorganisation der Angiogeneese. Diese Prozesse führen in ihrer Gesamtheit zur Unterstützung der Tumorprogression und Zunahme der malignen Potenz (Liotta LA et al., 2001; Proia DA et al., 2005; Stuelten CH et al., 2010).

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Tumorstromazellen für das Wachstum maligner Zellen. So konnten wir eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate von LLC1-Zellen unter der Interaktion mit makrophagen-/ monozytenkonditionierten Medien im Vergleich zur Wachstumsrate von LLC1-Zellen unter LLC1-Zellkulturmedium zeigen. Diesen Wandel ihrer Funktion erfahren die Monozyten und Makrophagen aufgrund der

spezifischen Manipulationsfähigkeit maligner Zellen, mit Hilfe derer sie die Unterstützung von Stromazellen erlangen (Solinas G et al., 2009; Pollard JW, 2009).

Des Weiteren fanden wir eine deutliche Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen in den Medien, welche aus der Interaktion von LLC1-Zellen mit Monozyten / Makrophagen stammten. Alle diese Zytokine, die vermehrt in der Interaktion der malignen Zellen mit Makrophagen / Monozyten sezerniert wurden, haben das Potenzial, maligne Zellen in ihren Belangen zu unterstützen. So vermag IL-10 das Tumorwachstum mittels der Induktion von Angiogeneese (Pollard JW, 2004; Torisu H et al., 2000), des Primings von benachbartem Gewebe für die Expansion und Invasion in Nachbargewebe (Bormann K et al., 2009) oder der Unterstützung zur Metastasierung (Giavazzi R et al., 1990; Mantovani A et al., 2008) zu fördern. IL-6 besitzt ebenfalls tumorunterstützende Funktionen, indem es antiapoptotisch auf maligne Zellen wirkt (Naugler WE et al., 2008) und ebenfalls zu deren Expansion sowie Invasion in benachbartes Gewebe beiträgt (Allavena P et al., 2008). Über proangiogene Effekte (Tartour E et al, 1999; Numasaki M et al., 2005; Numasaki M et al., 2003) und eine Triggerung von IL-6 (Lin W-W et al., 2007) vermag IL-17, die Tumorentwicklung zu fördern. Durch eine Polarisation von Makrophagen zu einem M2 Phänotypen, welcher ebenfalls maligne Zellen unterstützt, vermögen IL-4 und IL-10 ihren Beitrag zu einem gesteigerten Tumorzellwachstum zu leisten (Lewis CE et al., 2006). Unter diesen Aspekten erscheinen die von uns gefundenen erhöhten Zytokinkonzentrationen in den Interaktionsmedien sinnvoll. Vor allem in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Proliferationsversuche, in denen sich unter der Einwirkung eben jener Zytokine ein erhöhtes Wachstum der malignen Zellen zeigte, erscheinen unsere Ergebnisse schlüssig.

In den Sorafenib beeinflussten Proliferationsversuchen zeigten sowohl die LLC1-Tumorzellen als auch die Makrophagen / Monozyten unter der Kultivierung mit Sorafenib ein reduziertes Zellwachstum. Weiterhin führte die Inkubation von LLC1-Zellen mit Interaktionsmedien von Makrophagen / Monozyten und Sorafenibzusatz ebenfalls zu einer verminderten LLC1-Zellproliferation. Im Vergleich zu der Kultivierung der LLC1-Zellen unter LLC1-Zellkulturmedium und Sorafenib zeigte sich hier sogar ein stärkerer Wachstumsreduktionstrend.

Zum einen bestätigen diese Ergebnisse die in anderen Studien beschriebene Wirkung von Sorafenib, sich inhibitorisch auf das Proliferationsverhalten maligner Zellen auszuwirken (Henderson YC et al., 2008; Liu L et al., 2006; Trivedi N et al., 2004). Zum anderen zeigen diese Ergebnisse, dass Sorafenib sowohl Makrophagen als auch Monozyten direkt in ihrem Wachstum beeinflussen kann und somit immunmodulatorische Funktionen innehat. Des Weiteren zeigt sich in den Ergebnissen der LLC1-Zellproliferation unter den Interaktionsmedien mit Sorafenibzusatz, dass Sorafenib nicht nur auf die malignen und nicht malignen, sondern auch auf deren gegenseitigen Interaktionsprozess einen Einfluss hat.

Unter der Einwirkung von Sorafenib veränderte sich die Zytokinsekretion der miteinander interagierenden LLC1-Zellen und Makrophagen / Monozyten, womit wir auch hier zeigen konnten, dass Sorafenib die Interaktion maligner und nicht maligner Zellen beeinflusst und in diesem Rahmen einen Effekt auf die unter der Interaktion erfolgende Zytokinexpression hat. Wir fanden in den Interaktionsmedien eine Steigerung antiinflammatorischer sowie tumorinhibitorisch wirkender Zytokine und eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine. Dabei zeigten sich gesteigerte Konzentrationen von IL-12 und GM-CSF, welche vor allem, aber nicht nur, über die Induktion einer potenten Antigenpräsentation inhibitorisch auf Tumore wirken (Dranoff G, 2002; Bubenik J, 2011). Des Weiteren zeigten sich erhöhte Konzentrationen der klassischen antiinflammatorischen Zytokine: IL-4 und IL-13. Kontextabhängig können diese beiden Zytokine sowohl der Tumorentwicklung entgegenwirken (Kawakami K et al., 2000; Gooch JL et al., 2002; Serve H et al., 1996; Obiri NI et al., 1996; Renard N et al., 1994), diese aber unter entsprechenden Mikroklimabedingungen über verschiedene Mechanismen auch unterstützen (Prokopchuk O et al., 2005; Fujisawa T et al., 2009; Formentini A et al., 2009). Unter den von uns geschaffenen Bedingungen ist für IL-4 sowohl ein tumorinhibitorischer Effekt (durch die Sorafenib induzierte Hemmung von Stat 3) als aber auch, in Zusammenspiel mit IL-13/IL-10 und der M2-Polarisation von Makrophagen, ein tumorunterstützender Effekt denkbar.

Die Wirkungen eines einzelnen Zytokins können mannigfaltig und divergent sein. Eine pauschale Effektzuzuweisung ist deshalb nicht möglich, sondern muss im situativen Kontext

gesehen werden. Dabei besteht auch die Möglichkeit, auf unterschiedliche Zellen eine unterschiedliche Wirkung entfalten zu können.

Rückschauend weisen die Ergebnisse der Proliferations- und Zytokinexpressionsversuche (mit Interaktionsmedien) unter Sorafenibwirkung in eine gemeinsame Richtung. In den Interaktionsmedien fanden sich vermehrt antiinflammatorische und tumorinhibitorische Zytokine, welche die Proliferation maligner Zellen zu hemmen vermögen, bei reduzierten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine. Entsprechend zeigen die Ergebnisse der Proliferationsversuche unter konditionierten Medien ein vermindertes Zellwachstum der malignen Zellen und sogar einen stärkeren Wachstumsreduktionstrend als bei der Kultivierung von LLC1-Zellen unter LLC1-Kulturmedium und Sorafenib. Hierin spiegelt sich wieder der Einfluss von Sorafenib auf den Interaktionsprozess der malignen Zellen und Makrophagen / Monozyten wider.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass

- die Interaktion von Tumorstromazellen mit Tumorzellen einen wichtigen Motor der Tumorphiliferation darstellt und einen guten Angriffspunkt in der Behandlung maligner Neoplasien bildet,
- Multikinaseinhibitoren ein vielversprechendes und potentes Mittel zur Wachstumsminderung von malignen Zellen darstellen, deren Wirkung sich zum einen direkt auf die Tumorzellen sowie die Immunzellen, aber auch auf deren gegenseitigen Interaktionsprozess bezieht,
- das Feld des Tumormikromilieus ein in Zukunft sehr attraktives Forschungsfeld bezüglich neuer Therapieoptionen maligner Erkrankungen darstellt, in denen Fragen des WARUM und WIE zu klären sind.

6.4 Potenzielle Fehlerquellen

Wir haben zur Reduzierung potenzieller Fehler alle von uns beeinflussbaren Faktoren durch sorgfältiges und hygienisches Arbeiten, Standardisierung und Objektivierung unserer Messverfahren soweit möglich eliminiert.

In den Untersuchungen der Zytokinkonzentrationen verwendeten wir einen ELISA-Antibody-capture-assay. In den Messungen der IL-6 Werte passierten die Konzentrationen in den Cokultivierungsmedien die vom Hersteller angegebenen Obergrenzen. Dies mag die Beurteilbarkeit der IL-6 Entwicklung in den Cokultivierungsversuchen unter der Wirkung von Sorafenib im Vergleich ohne Sorafenibapplikation in Abschnitt 5.6 einschränken.

7 Zusammenfassung und Summary

7.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion von Tumorstromazellen am Beispiel muriner Monozyten / Makrophagen mit Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen (LLC1-Zellen). Im Fokus des Interesses stand dabei die Untersuchung des Proliferations- und Zytokinexpressionsverhaltens unter gegenseitiger Cokultivierung. Des Weiteren interessierte uns der Effekt des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf LLC1-Zellen, murine Monozyten / Makrophagen sowie auf deren wechselseitige Interaktion.

Wir generierten aus murinem Knochenmark sowohl Monozyten als auch Makrophagen und inkubierten die ausdifferenzierten Zellen zusammen mit LLC1-Zellen. In einer weiteren Versuchsreihe fügten wir miteinander interagierenden Monozyten / Makrophagen und LLC1-Tumorzellen den Multikinaseinhibitor Sorafenib hinzu. Die aus den Cokultivierungsversuchen gewonnenen Medien wurden für Proliferationsversuche sowie Zytokinexpressionsuntersuchungen verwendet.

Unsere Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Tumorstromazellen für malignes Zellwachstum. Wir fanden ein signifikant gesteigertes LLC1-Zellwachstum unter der Inkubation mit monozyten- und makrophagenkonditionierten Medien. Des Weiteren zeigte sich eine deutliche Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen in den Medien, welche aus der Interaktion von LLC1-Zellen mit Monozyten / Makrophagen stammten.

In den Sorafenib beeinflussten Versuchen zeigte sich eine Reduktion des LLC1-Zellwachstums sowohl unter der Applikation von Sorafenib als auch unter sorafenib-monozyten- und makrophagenkonditionierten Medien. Weiterhin führte die Applikation von Sorafenib zu Monozyten- / Makrophagenpopulationen zu einer deutlichen Proliferationsabnahme der Monozyten / Makrophagen. Damit konnten wir zum einen zeigen, dass Sorafenib einen direkten Effekt auf LLC1-Zellen hat und zum anderen konnten wir Sorafenib ein immunmodulatorisches Potenzial nachweisen. Des Weiteren zeigte sich uns ein stärkerer wachstumsinhibitorischer Trend für Sorafenib unter der Tumorstromainteraktion im Vergleich zu seiner Wirkung alleine auf LLC1-Zellen.

Hinsichtlich des Zytokinexpressionsmusters von LLC1-Zellen und Monozyten / Makrophagen führte Sorafenib zu einer deutlichen Abnahme proinflammatorischer Zytokinkonzentrationen und einer Steigerung antiinflammatorischer Zytokinspiegel in den konditionierten Medien.

7.2 Summary

The aim of this study was to investigate the influence of the interaction of murine monocytes and macrophages with lewis lung carcinoma cells (LLC1 cells) on the proliferation and cytokine expression patterns of tumor and stromal cells. Furthermore, we were interested in the effect of the multikinase inhibitor sorafenib on LLC1 cells, murine monocytes and macrophages and their mutual interaction.

We generated both monocytes and macrophages from murine bone marrow and incubated the cells with LLC1 cells. In another series of experiments, we added the multikinase inhibitor sorafenib to interacting monocytes / macrophages and LLC1 tumor cells. The media were used for both proliferation tests and cytokine expression tests.

Our results demonstrate the importance of tumor stromal cells for malignant cell growth. We found a significantly increased LLC1 cell growth when the cells were incubated with monocyte / macrophage conditioned media. In addition, we found a significant increase of proinflammatory cytokines in the media, which originated from the interaction of LLC1 cells with monocytes / macrophages.

The sorafenib influenced trials showed both a reduction of the LLC1 cell growth, whether the tumor cells were incubated with sorafenib or with sorafenib in monocytes / macrophages incubated media. Furthermore, the application of sorafenib to monocyte / macrophage populations led to a significant decrease in the proliferation of these cells. Thus we have shown for the first time that sorafenib has a direct effect on LLC1 cells. Besides we demonstrated an immunomodulatory potential of sorafenib. Furthermore, we showed a stronger trend for sorafenib to inhibit cell proliferation under the tumor stromal cell interaction compared to its effect alone on LLC1 cells. Regarding the cytokine expression patterns of LLC1 cells and monocytes / macrophages sorafenib resulted in a marked

decrease of proinflammatory cytokines and an increase of anti-inflammatory cytokine levels in the conditioned media.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL	Chemokin der CC-Chemokinfamilie
c-KIT	Tyrosinkinase KIT
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal Calv Serum
FSP-1	Fibroblasten-sezernierte-Protein
g	Erdschwerebeschleunigung
IL	Interleukin
LLC1-Zellen	Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
MCP	Monozyten Chemotaktisches Protein
MEK	Mitogen-aktivierte Kinase
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μm	mikromolar
MMP	Matrix Metallproteinase
nm	nanomolar
NSCLC	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
P/S	Penicillin / Streptomycin

Raf	Protoonkogen (Name abgeleitet von <i>Rapid fibrosarcoma</i>)
Ras	Protoonkogen (Name abgeleitet von <i>Rat adeno sarcoma</i>)
rm-GMCSF	recombinant murine Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
rm-MCSF	recombinant murine macrophage colony-stimulating factor
INF	Interferon
RPM	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom
Ser	Serin
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TGF	Transforming growth factor
TH	T-Helferzellen
THR	Threonin
TNM	Klassifikationsschema maligner Tumore der UICC
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumormikroumgebung. _____	10
Abbildung 2: Kultivierung von LLC1-Zellen mit murinen Makrophagen / Monozyten. ____	28
Abbildung 3: Cokultivierung von LLC1-Zellen mit murinen Makrophagen / Monozyten. 30	
Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Cokultivierung. _____	31
Abbildung 5: Cokultivierungsmodell. _____	33
Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Makrophagenmorphologie. ____	40
Abbildung 7: Morphologie der Monozyten. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung. ____	41
Abbildung 8: Morphologie der Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen. _____	42
Abbildung 9: Proliferationsverhalten von LLC1-Tumorzellen. _____	44
Abbildung 10: Makrophagen-LLC1-Zytokinexpressionsmuster. _____	46
Abbildung 11: Monozyten-LLC1-Zytokinexpressionsmuster. _____	47
Abbildung 12: Die Auswirkungen von Sorafenib auf das Proliferationsverhalten von LLC1-Zellen. _____	50
Abbildung 13: Sorafenibeeinfluss auf das Makrophagen-LLC1-Zytokinexpressionsmuster. 52	
Abbildung 14: Der Effekt von Sorafenib auf das Monozyten-LLC1-Zytokinexpressionsmuster. _____	53
Abbildung 15: Das Proliferationsverhalten von Makrophagen unter der Einwirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib. _____	55
Abbildung 16: Der Effekt von Sorafenib auf das Proliferationsverhalten von Monozyten. _	56

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 2: Reagenzien, Zytokine und Antibiotika	21
Tabelle 3: Antikörper und Färbungen	22
Tabelle 4: Geräte	23
Tabelle 5: Ergebnisse der Cokultivierungs- und Proliferationsversuche	57

11 Literaturangaben

Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. *The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance.* Immunological Reviews, 2008; 222: 155–161.

Aspord C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, Palucka AK. *Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development..* JEM © The Rockefeller University Press., 2007; 204: 1037–1047.

Balkwill, F. *Cancer and the chemokine network.* Nat. Rev. Cancer, 2004; 4: 540-550.

Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G. *Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men.* Chest, 1997; 112: 1474-1479.

Bartecchi CE, MacKenzie TD, Schrier RW. *The Human Costs of Tobacco Use—First of Two Parts.* New England Journal of Medicine, 1994; 333: 907-912.

Beacham DA, Cukierman E. *Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression.* Semin. Cancer Biol., 2005; 5: 329-41.

Beadsmoore CJ, Screaton NJ. *Classification, staging and prognosis of lung cancer.* Eur. J. Radiol., 2003; 45: 8-17.

Bhowmick NA, Moses HL. *Tumor-stroma interactions.* Curr. Opin. Genet. Dev., 2005; 1: 97-101.

Blankenstein T. *The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system.* Curr. Opin. Immunol., 2005; 17: 180–186.

Bisht M, Bist SS, Dhasmana DC. *Biological response modifiers: Current use and future prospects in cancer therapy.* Indian Journal of Cancer, 2010; 47: 442-451.

Biswas SK, Sica A, Lewis CE. *Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms.* J. Immunol., 2008; 180: 2011–2017.

Blume-Jensen P, Hunter T. *Oncogenic kinase signalling.* Nature, 2001; 6835: 355-65.

Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T. *Signalling and survival pathways in multiple myeloma.* Eur. J. Cancer, 2006; 42: 1574–1580.

Bormann K-H, Stühmer C, Z'Graggen M, Kokemüller H, Rücker M, Gellrich N-C. *IL-1 Polymorphism and Periimplantitis.* Schweiz. Monatsschr. Zahnmed., 2010; 120: 510-515.

Bouck N. *Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes.* Cancer Cells, 1990; 2: 179-185.

Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrinz B, Shimosato Y. *The new World Health Organization classification of lung tumours.* Eur. Respir. J., 2001; 18: 1059–1068.

Brenner DR, Hung RJ, Tsao MS, Shepherd FA, Johnston MR, Narod S, Rubenstein W, Mc Laughlin JR. *Lung cancer risk in never-smokers: a population-based case-control study of epidemiologic risk factors.* BMC Cancer, 2010; 10: 285.

Bubenik J. *Interleukin 12 in Cancer Treatment.* Folia Biologica (Praha), 2011; 57: 1-2.

Cakarova L, Marsh LM, Wilhelm J, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S. *Macrophage TNF- α induces epithelial expression of GM-CSF: impact on alveolar epithelial repair.* Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2009; 180: 521-532.

Chang SH, Dong C. *Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation.* Cell Signal., 2010; 23: 1069-75.

Chang TL, Peng X, Fu XY. *Interleukin-4 mediates cell growth inhibition through activation of Stat1.* J. Biol. Chem., 2000; 275: 10212–10217.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.* Nat. Rev. Cancer, 2002; 2: 563-572.

Chauhan D et al. *Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF- κ B.* Blood, 1996; 87: 1104–1112.

Chu XY, Chen LB, Zang J, Wang JH, Zhang Q, Geng HC. *Effect of bone marrow-derived monocytes transfected with RNA of mouse colon carcinoma on specific antitumor immunity.* World J. Gastroenterol., 2005; 11: 760-3.

Colombo MP, Trinchieri G. *Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy.* Cytokine & Growth Factor Reviews, 2002; 13: 155–168.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability.* Carcinogenesis., 2009; 7: 1073-81.

Coussens LM, Werb Z. *Inflammation and cancer.* Nature, 2002; 420: 860–867.

Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Molecular Cell Biology.* 2nd ed. Scientific American Books, 1990.

Devaraj S, Jialal I. *Inhibits Transformation to the M2 Phenotype and C-Reactive Protein Polarizes Human Macrophages to an M1 Phenotype.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2011; 31: 1397-1402.

Direkze NC, Alison MR. *Bone marrow and tumor stroma: an intimate relationship.* Hematol. Oncol., 2006; 26: 189-195.

Dranoff G. *GM-CSF-based cancer vaccines.* Immunological Reviews, 2002; 188: 147–154.

Dranoff G. *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy.* Nat. Rev. Cancer, 2004; 4: 11-22.

Egeblad M, Littlepage LE, Werb Z. *The Fibroblastic Coconspirator in Cancer Progression.* Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol., 2005; 70: 383–388.

Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. *Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection.* J. Leukoc. Biol., 1998; 64: 275–90.

Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008.* European Journal of Cancer, 2010; 46: 765-781.

Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.* International Journal of Cancer, 2010;127: 2893-2917.

Formentini A, Prokopchuk O, Sträter J, Kleeff J, Grochola LF, Leder G, Henne-Bruns D, Korc M, Kornmann M. *Interleukin-13 exerts autocrine growth-promoting effects on human pancreatic cancer, and its expression correlates with a propensity for lymph node metastases.* Int. J. Colorectal Dis., 2009; 24:57–67.

Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, Puri RK. *Cancer Invasion and Metastasis. A Novel Role of Interleukin-13 Receptor $\alpha 2$ in pancreatic cancer invasion and mwtastasis.* Cancer Res., 2009; 22: 8678-85.

Giavazzi R, Garofalo A, Bani MR, Abbate M, Ghezzi P, Boraschi D, Mantovani A, Dejana E. *Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice.* Cancer Res., 1990; 50: 4771-4775.

Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, Berman T, Joyce JA. *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion.* Genes Dev., 2010; 24: 241-255.

Gooch JL, Lee AV, Yee D. *Interleukin -4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells.* Cancer Res., 1998; 58: 4199 – 205.

Gooch JL, Christyy B, Yee D. *STAT6 Mediates Interleukin-4 Growth Inhibition in Human Breast Cancer Cells.* Neoplasia, 2002; 4: 324 – 331.

Gordon, S. *Alternative activation of macrophages.* Nat. Rev. Immunol., 2003; 3:23-25.

Halevy O, Michalovitz D, Oren M. *Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities.* Science, 1990; 250:113-116.

Hammerschmidt S, Wirtz H. *Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment.* Deutsches Ärzteblatt International, 2009; 106: 809–20.

Henderson YC, Ahn SH, Kang Y, Clayman GL. *Sorafenib potently inhibits papillary thyroid carcinomas harboring RET/PTC1 rearrangement.* Clin. Cancer Res., 2008; 14: 4908–14.

Hill HC, Conway TF Jr., Sabel MS, Jong YS, Mathiowitz E, Bankert RB, Egilmez KK. *Cancer immunotherapy with interleukin 12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encapsulated microspheres: coinduction of innate and adaptive antitumor immunity and cure of disseminated disease.* Cancer Res., 2002; 62: 7254–7263.

Hipp MM, Hilf N, Walter S, Werth D, Brauer KM, Radsak MP, Weinschenk T, Singh-Jasuja H, Brossart P. *Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses.* Blood, 2008; 111: 5610-20.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *P53 mutations in human cancers.* Science, 1991; 253: 49-53.

Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. *Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience.* J. Interferon Cytokine Res., 1999; 19: 697–703.

Jinushi M, Tahara H. *Cytokine gene-mediated immunotherapy: Current status and future perspectives.* Cancer Sci., 2009; 100: 1389–1396.

Joyce JA, Pollard JW. *Microenvironmental regulation of metastasis: tumor-stroma interactions at primary site.* Nat. Rev. Cancer, 2009; 9: 239-252.

Kanai T, Watanabe M, Hayashi A, Nakazawa A, Yajima T, Okazawa A, Yamazaki M, Ishii H, Hibi T. *Regulatory effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion.* British Journal of Cancer, 2000; 82: 1717–1723.

Kawakami K, Leland P, Puri RK. *Structure, Function, and Targeting of Interleukin 4 Receptors on Human Head and Neck Cancer Cells.* Cancer Res., 2000; 60: 2981-2987.

Kimura YN, Watari K, Fotovati A, Hosoi F, Yasumoto K, Izumi H, Kohno K, Umezawa K, Iguchi H, Shirouzu K, Takamori S, Kuwano M, Ono M. *Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis.* Cancer Sci., 2007; 98: 2009-2018.

Krusch M, Salih J, Schlicke M, Baessler T, Kampa KM, Mayer F, Salih HR. *The kinase inhibitors sunitinib and sorafenib differentially affect NK cell antitumor reactivity in vitro.* J. Immunol., 2009; 183: 8286-94.

Kundu N, Fulton AM. *Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, down-regulates MHC class I, and enhances NK lysis.* Cell. Immunol., 1997; 180: 55–61.

Kurahara H, Shinchu H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S. *Significance of M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage in Pancreatic Cancer.* Journal of Surgical Research, 2011; 167: e211-9.

Kurosu T, Ohki M, Wu N, Kagechika H, Miura O. *Sorafenib induces apoptosis specifically in cells expressing BCR/ABL by inhibiting its kinase activity to activate the intrinsic mitochondrial pathway.* Cancer Res., 2009; 69: 3927-3936.

Lam S, LeRiche JC, Zheng Y, Coldman A, MacAulay C, Hawk E, Kelloff G, Gazdar AF. *Sex-related differences in bronchial epithelial changes associated with tobacco smoking.* J. Natl. Cancer Inst., 1999; 91: 691-696.

Lee J, Mao L, Hong W. *Biology of preneoplastic lesions.* In: Roth J, Cox J, Hong W. *lung cancer* 2nd Ed. Oxford: Blackwell Science, 1998.

Lewis CE, Pollard JW. *Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments.* Cancer Res., 2006; 66: 605-612.

Li H, Fan X, Houghten JM. *Tumor Microenvironment: The role of the Tumor Stroma in Cancer.* Journal of Cellular Biochemistry, 2007; 101: 805-815.

Lin H, Chen K, Chen BD-M. *Resistance of bone marrow-derived macrophages to apoptosis is associated with the expression of x-linked inhibitor of apoptosis protein in primary cultures of bone marrow cells.* Biochem. J., 2001; 353: 299-306.

Lin W-W, Karin M. *A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer.* The Journal of Clinical Investigation, 2007; 117: 1175-83.

Liu D, Wang F, Zou Z, Dong S, Wang J, Ran X, Li C, Shi C, Su Y. *Bone Marrow Derivation of Interstitial Cells of Cajal in Small Intestine Following Intestinal Injury.* Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010; 2010: 164986.

Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, Lin Z, Zhu B. *IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011; 407: 348-354.

Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. *Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5.* Cancer Res., 2006; 66: 11851–8.

Liotta LA, Kohn EC. *The microenvironment of the tumour-host interface.* Nature, 2001; 411: 375-9.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.* Cell., 1991; 64: 327-336.

Ma H-L, Whitters MJ, Jacobson BA, Donaldson DD, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. *Tumor cells secreting IL-13 but not IL-13Ra2 fusion protein have reduced tumorigenicity in vivo.* International Immunology, 2004; 16: 1009-17.

Malkinson AM. *Role of inflammation in mouse lung tumorigenesis: a review.* Exp. Lung. Res., 2005; 31: 57–82.

Mangiameli DP, Blansfield JA, Kachala S, Lorang D, Schafer PH, Muller GW, Stirling DI, Libutti SK. *Combination therapy targeting the tumor microenvironment is effective in a model of human ocular melanoma.* Journal of Translational Medicine, 2007; 5: 38.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.* Trends Immunol., 2002; 23: 549–55.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. *Cancer-related inflammation.* Nature, 2008; 454: 436–444.

Minami M, Shimizu K, Okamoto Y, Folco E, Iwasaka ML, Feinberg MW, Aikawa M, Libby PJ. *Prostaglandin E receptor type 4-associated protein interacts directly with NF-kappaB1 and attenuates macrophage activation.* Biol. Chem., 2008; 283: 9692-703.

Mocellin S, Marincola FM, Young HA. *Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint.* J. Leukoc. Biol., 2005; 78: 1043–1051.

Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis.* Nature Reviews. Cancer., 2008; 8: 618-31.

Nair RE, Jong YS, Jones SA, Sharma A, Mathiowitz E, Egilmez NK. *IL-12 + GM-CSF microsphere therapy induces eradication of advanced spontaneous tumors in her-2/neu transgenic mice but fails to achieve long-term cure due to the inability to maintain effector T-cell activity.* J. Immunother., 2006; 29: 10–20.

Naugler WE, Karin M. *The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer.* Trends Mol. Med., 2008; 14: 109–119.

Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson MR, Kellerher RJ Jr., Yokota SJ, Bankert RB. *Characterization of Human Lung Tumor-Associated Fibroblasts and Their Ability to Modulate the Activation of tumor-associated T Cells.* J. Immunol., 2007; 178: 5552-5562.

Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT. *Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth.* Blood, 2003; 101: 2620–2727.

Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, Hishinuma T, Goto J, Lotze MT, Kolls JK, Sasaki H. *IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis.* J. Immunol., 2005; 175: 6177–6189.

Obiri NI, Husain SR, Debinski W, Puri RK. *Interleukin 13 inhibits growth of human renal cell carcinoma cells independently of the p140 interleukin 4 receptor chain.* Clin. Cancer Res., 1996; 2: 1743–49.

Ogden CA, Pound JD, Batth BK, Owens S, Johannessen I, Wood K, Gregory CD. *Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma.* J. Immunol., 2005; 174: 3015–3023.

Osann KE. *Lung Cancer in Women: The Importance of Smoking, Family History of Cancer, and Medical History of Respiratory Disease.* Cancer Research, 1991; 51: 4893–4897.

Osborne J, Moore PS, Chang Y. *KSHV encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signalling pathways.* Hum. Immunol., 1999; 60: 921–927.

Peddareddigari VG, Wang D, DuBois RN. *The Tumor Microenvironment in Colorectal Carcinogenesis.* Cancer Microenvironment., 2010; 3: 149–166.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. *Interleukin-10 and related cytokines and receptors.* Annu. Rev. Immunol., 2004; 22: 929–979.

Pollard JW. *Trophic macrophages in development and disease.* Nature Reviews Immunology., 2009; 9: 259–70.

Pollard JW. *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis.* Nat. Rev. Cancer, 2004; 4: 71-8.

Porta C, Paglino C, Imarisio I, Ganini C, Pedrazzoli P. *Immunological Effects of Multikinase Inhibitors for Kidney Cancer: A Clue for Integration with Cellular Therapies?* J. Cancer, 2011; 2: 333-338.

Porta C, Larghib P, Rimoldic M, Totarob MG, Allavenac P, Mantovanic A, Sicaa A. *Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer.* Immunobiology, 2009; 214: 761–777.

Powell CA, Dubey S. *Update in lung cancer 2008.* Am. J. Respi. Crit. Care. Med., 2009; 179: 860-868.

Powell CA, Borczuk AC, Toonkel RL. *Genomics of lung cancer.* Proc. Am. Thorac. Soc., 2008; 6: 152-158.

Proia DA, Kuperwasser C. *StromaTumor Agonist or Antagonist.* Cell Cycle, 2005; 4: 1022-1025.

Prokopchuk O, Liu Y, Henne-Bruns D, Kornmann M. *Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: Evidence for autocrine and paracrine actions.* Br. J. Cancer, 2005; 92: 921–928.

Rautert R, Schinköthe T, Franklin J, Weihrauch M, Boll B, Pogge E, Bredenfeld H, Engert A, Diehl V, Re D. *Elevated pretreatment interleukin-10 serum level is an International Prognostic Score (IPS)–independent risk factor for early treatment failure in advanced stage Hodgkin lymphoma.* Leuk. Lymphoma., 2008; 49: 2091–2098.

Redente EF, Orlicky DJ, Bouchard RJ, Malkinson AM. *Tumor signaling to the Bone Marrow Changes the phenotype of Monocytes and Pulmonary Macrophages during Urethane-Induced Primary Lung Tumorigenesis in A/J Mice.* The American Journal of Pathology, 2007; 170: 693-707.

Renard N, Duvert V, Banchereau J, Saeland S. *Interleukin-13 inhibits the proliferation of normal and leukemic human B-cell precursors.* Blood, 1994; 84: c2253–60.

Ripley D, Shoup B, Majewski A, Chegini N. *Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas.* Gynecol. Oncol., 2004; 92: 761–768.

Rivera MP. *Lung cancer in women: the differences in epidemiology, biology and treatment outcomes.* Expert. Rev. Respir. Med., 2009; 3: 627-34.

Robinson S-C, Scott KA, Balkwill FR. *Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF- α .* Eur. J. Immunol., 2002; 32: 404–412.

Rojas M, Marie B, Vignaud JM, Martinet N, Siat J, Grosdidier G, Cascorbi I, Alexandrov K. *High DNA damage by benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma.* Cancer Lett., 2004; 207: 157-163.

Roland M, Rudd RM. *Genetics and pulmonary medicine. 7. Somatic mutations in the development of lung cancer.* Thorax, 1998; 53: 979-983.

Rubens MB, Simon PG, Padley A. *Tumors of the lung.* Textbook of Radiology and Imaging. TR7E-04(107-130) 6/24/02.

Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, Bottazzi B, Colombo MP, Mantovani A, Sica A. *p50 nuclear factor- κ B overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance.* Cancer Res., 2006; 66: 11432–11440.

Savai R, Schermuly RT, Schneider M, Savai Pullamsetti S, Grimminger F, Seeger W, Banat G-A. *Hybrid-primed lymphocytes and hybrid vaccination prevent tumor growth of lewis lung carcinoma in mice.* J. Immunother., 2005; 29: 175-87.

Scatizzi J-C, Mavers M, Hutcheson J, Young B, Shi B, Pope RM, Ruderman EM, Samways SK, Corbett JA, Egan TM, Perlman H. *The cyclin dependent kinase domain of p21 is a suppressor of IL-1 β -mediated inflammation in activated macrophages.* Eur. J. Immunol., 2009; 39: 820–825.

Schwartz AG, Rothrock M, Yang P, Swanson GM. *Increased cancer risk among relatives of nonsmoking lung cancer cases.* Genet. Epidemiol., 1999; 17:1-15.

Serve H, Oelmann E, Herweg A, Oberberg D, Serve S, Reufi B, Mücke C, Minty A, Thiel E, Berdel WE. *Inhibition of proliferation and clonal growth of human breast cancer cells by interleukin 13.* Cancer Res., 1996; 56: 3583–88.

Sinha S, Kaler LJ, Proctor TM, Teuscher C, Vandenbark AA, Offner H. *IL-13-mediated gender difference in susceptibility to autoimmune encephalomyelitis.* J. Immunol., 2008; 180: 2679-85.

Skinnider BF, Kapp U, Mak TW. *Interleukin 13: a growth factor in Hodgkin lymphoma.* Int. Arch. Allergy. Immunol., 2001; 126: 267–276.

Skinnider BF, Kapp U, Mak TW. *The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma.* Leuk. Lymphoma., 2002; 43:1203-10.

Smigielska-Kuzia J, Boćkowski L, Sobaniec W, Sendrowski K, Zelazowska-Rutkowska B, Cholewa M. *Anti-inflammatory plasma cytokines in children and adolescents with Down syndrome.* Folia Histochem. Cytobiol., 2010; 48: 667-70.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. *Tumor-associated macrophages (TAM) as major player of the cancer-related inflammation.* Journal of Leucocyte Biology, 2009; 86: 1-9.

Stuelten CH, Bush JI, Tang B, Flanders KC, Oshima A, Sutton E, Karpova TS, Roberts AB, Wakefield LM, Niederhuber JE. *Transient Tumor Fibroblast Interactions Increase Tumor Cell Migration by TGF- β Mediated Mechanism in a Mouse Xenigraft Model of Breast Cancer.* PLoS One., 2010; 5: e9832.

Tai WT, Cheng AL, Shiau CW, Huang HP, Huang JW, Chen PJ, Chen KF. *Signal transducer and activator of transcription 3 is a major kinase-independent target of sorafenib in hepatocellular carcinoma.* J. Hepatol., 2011; 55: 1041-8.

Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, Yan L. *Tumor-Stroma Interaction: Positive Feedback regulation of Extracellular Matrix Metallproteinase Inducer (EMMPRIN) Expression and Matrix Metallproteinase-Dependent Generation of Soluble EMMPRIN.* Oncology research, 2004; 2: 73-80.

Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. *Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice.* Cancer Res., 1999; 59: 3698–3704.

Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. *Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth.* Cancer Immunol. Immunother., 2004; 53: 79–85.

Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, Di Stefano AB, Di Bernardo C, Agrusa A, Condorelli G, Walczak H, Stassi G. *Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4.* Cell Death Differ., 2008; 15: 762–772.

Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. *Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF α and IL-1 α .* Int. J. Cancer, 2000; 85, 182–188.

Trivedi N, Sharma A, Zimmerman M, Smith CD, Tuveson D, Robertson GP. *Inhibition of BRAF activity by the Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 inhibits melanoma tumor development.* Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 2004; 45: 887.

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral anti-tumor activity and targets the Raf/ MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.* Cancer Res., 2004; 64: 7099–7109.

Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. *Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer.* Nature reviews Drug Discov., 2006; 5: 835-844.

Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, Virmani AK, Jagirdar J, Thomas B, Ioachim HL, Litzky LA, Brambilla EM, Minna JD, Gazdar AF. *Comparison of molecular changes in lung cancers in HIV-positive and HIV-indeterminate subjects.* JAMA, 1998; 279:1554-1559.

Zhong L, Roybal R, Chaerkady R, Zhang W, Choi K, Alvarez CA, Tran H, Creighton CJ, Yan S, Strieter RM, Pansey A, Kurie JM. *Identification of secreted proteins that mediate cell-cell interactions in an in vitro model of lung cancer microenvironment.* Cancer Research, 2008; 68: 7237-7245.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Zu allererst möchte ich meinen Betreuern, Mentoren und Freunden PD Dr. A.G. Banat und Dr. R. Savai für ihre Unterstützung und ihren Glauben an die Sache danken. Ohne ihre fachlichen und menschlichen Fähigkeiten wäre ich niemals so weit gekommen.

Ich danke herzlich meiner Kollegin und Freundin Anja Schmall, die sowohl bei der praktischen als auch der theoretischen Umsetzung dieser Arbeit eine tragende Rolle gespielt hat. Vielen Dank für das Korrekturlesen!

Ich möchte mich auch recht herzlich bei Marianne Hoeck für ihre Freundschaft und Fürsorge bedanken und für die Geduld, mit der sie mir die vielen Dinge, die es in einem Labor zu wissen gibt, erklärt hat. Danke schön!

Ein herzliches Dankeschön geht an die Kollegen und Freunde aus dem Labor.

Meinem Partner Alexander und meinen Eltern danke ich für die unermüdliche Unterstützung dieser Arbeit und dafür, dass sie mir bei schlechter Laune und Frustration den nötigen Rückhalt gegeben haben. Alexander, danke für die Geduld bei der Lösung aller meiner emotional brisanten Computerprobleme!

Einen herzlichen Dank möchte ich auch meinen ehemaligen Kommilitonen Theresa (K.) R. Tiemeyer, Lars E. Bakken und Jan H. Eckermann für das Zuspätspielen verpasster Unterrichtsinhalte und das Ertragen meiner Launen aussprechen.

Last but not least möchte ich Herrn DP Dr. G.-A. Banat und Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimmering für die Unterstützung, die Zurverfügungstellung dieses Themas und der nötigen Mittel danken.

